

Calciumphosphat und biodegradierbare Polymere als Kompositmaterialien für Wirkstofftransport und Knochenersatz

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Gregor Dördelmann

geboren in Düsseldorf

Institut für Anorganische Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2015

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2011 bis März 2015 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Matthias Epple
Prof. Dr. Bettina Siebers
Vorsitzender: Prof. Dr. Karin Stachelscheid

Tag der Disputation: 28.05.2015

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Nanopartikel für den Wirkstofftransport	1
1.2 Kompositmaterialien als Knochenersatz	2
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Biomaterialien.....	4
2.1.1 Knochenersatzmaterialien	5
2.2 Biodegradierbare Polyester	7
2.3 Calciumphosphate.....	11
2.4 Kolloidchemische Grundlagen.....	13
2.4.1 DLVO-Theorie und Zeta-Potential	14
2.5 Zellbiologische Grundlagen	19
2.5.1 Endozytose von Nanopartikeln	19
2.5.2 Transfektion	24
2.5.3 Knochenaufbau und Knochengeweberemodellierung	32
3. Material und Methoden	35
3.1 Rasterelektronenmikroskopie	35
3.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie	35
3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	36
3.4 UV/Vis-Spektroskopie	37
3.5 Dynamische Lichtstreuung	38
3.6 Röntgenpulverdiffraktometrie	40
3.7 Thermogravimetrie	41
3.8 Elementaranalyse und Atomabsorptionsspektroskopie	41
3.9 Gefriertrocknung.....	42

4 Experimenteller Teil	43
4.1 Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel für den Wirkstofftransport.....	43
4.1.1 Synthese von Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikeln	43
4.1.2 Synthese von Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikeln.....	45
4.1.3 Synthese von Calciumphosphat-DNA-PLGA-Nanopartikeln	46
4.1.4 <i>Layer-by-Layer</i> -Beschichtung von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln	48
4.1.5 Zellbiologische Charakterisierung der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel	49
4.1.6 Kontinuierliche Herstellung von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln	54
4.2 Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel für den Wirkstofftransport.....	55
4.2.1 Synthese von Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln	55
4.2.2 Synthese von Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln	57
4.2.3 Synthese von Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikeln	59
4.2.4 Zellbiologische Charakterisierung der Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel	61
4.3 Calciumphosphat-Polylactid-Mikrokompositpartikel für den Knochenersatz.....	63
4.3.1 Synthese von Polylactid-Mikrokompositpartikeln	63
4.3.2 Mechanische Charakterisierung der Polylactid-Mikrokomposite	67
4.3.3 Zellbiologische Charakterisierung der Polylactid-Mikrokomposite.....	68
4.3.4 Degradationsuntersuchung bei 70 °C	70
4.3.5 Bestimmung der Rieselfähigkeit.....	71

5 Ergebnisse und Diskussion	72
5.1 Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel als Wirkstoffträger für Proteine und Nukleinsäuren	72
5.1.1 Einführung in die Thematik	72
5.1.2 Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel.....	75
5.1.3 Nukleinsäure-beladene Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel	79
5.1.4 Bestimmung der Verkapselungseffizienzen von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln für FITC-BSA, Plasmid-DNA und siRNA.....	82
5.1.5 <i>Layer-by-Layer</i> -Beschichtung mit polykationischen Polymeren.....	87
5.1.6 Untersuchung der biologischen Effekte im Zellkulturexperiment	89
5.1.7 Kontinuierliche Herstellung von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln.....	99
5.1.8 Zusammenfassung	104
5.2 Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel als Wirkstoffträger für hydrophobe und hydrophile Modellwirkstoffe	106
5.2.1 Einführung in die Thematik	106
5.2.2 Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikel.....	109
5.2.3 Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel.....	111
5.2.4 Bestimmung der Verkapselungseffizienz	113
5.2.5 Untersuchung der biologischen Effekte im Zellkulturexperiment	115
5.2.6 Zusammenfassung	120
5.3 Polylactid-Mikrokompositpartikel für die generative Fertigung von Knochenersatzmaterialien.....	121
5.3.1 Einführung in die Thematik	121
5.3.2 Synthese und Charakterisierung der verwendeten anorganischen Bestandteile	124
5.3.3 Synthese der Polylactid-Mikrokompositpartikel mittels einer PVA-stabilisierten Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Emulsion	129

5.3.4 Untersuchung der mechanischen Eigenschaften	143
5.3.5 Untersuchung der biologischen Effekte im Zellkulturexperiment.....	147
5.3.6 Untersuchung der sauren Degradation von LR704S- Mikrokompositen	151
5.3.7 <i>Pickering</i> -Emulsion	159
5.3.8 Zusammenfassung.....	162
6. Zusammenfassung und Ausblick	164
7. Literaturverzeichnis	167
8. Anhang.....	181
8.1 Liste der verwendeten Abkürzungen	181
8.2 Liste der verwendeten Geräte	184
8.3 Liste der verwendeten Chemikalien.....	185
8.4 Publikationsliste	187
8.5 Lebenslauf	190
9. Eidesstattliche Erklärung	191
10. Danksagung.....	192

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden Kompositmaterialien aus Calciumphosphat und biodegradierbaren Polymeren für zwei verschiedene Anwendungsbereiche vorgestellt. Im ersten Teil wird die Entwicklung und Charakterisierung von Calciumphosphat-Polymer-Nanopartikeln als nanopartikuläre Wirkstoffträger für die Gentherapie beschrieben, während im zweiten Teil die Synthese von Calciumphosphat-Polymer-Mikrokompositpartikeln und die Herstellung eines biodegradierbaren Knochenersatzmaterials im Vordergrund stehen.

1.1 Nanopartikel für den Wirkstofftransport

Die Nanomedizin ist ein Forschungsbereich der Nanotechnologie an der Schnittstelle von Physik, Chemie und Biologie. Die aktuellen Entwicklungen auf dem Gebiet der Nanotechnologie, eine Vielzahl von Materialien für unterschiedlichste Anwendungen im Nanometerbereich (der milliardste Teil eines Meters) zu synthetisieren, stellen ein großes Potential für medizinische Anwendungen dar.^[1] Neben dem alltäglichen Gebrauch in wasserabweisenden Beschichtungen (Lotus-Effekt),^[2, 3] Sonnenschutzmitteln^[4, 5] und anderen Kosmetika wie z.B. Deodorants, bieten Nanopartikel wegen ihrer geringen Größe einige interessante Eigenschaften für den Transport von Wirkstoffen.^[6-8] Durch die Verkleinerung der Größe eines Materials nimmt die Oberfläche im Vergleich zum Volumen deutlich zu, so dass sich die physikochemischen Eigenschaften des Materials ändern. Diese neuen Eigenschaften werden in der Nanomedizin genutzt, um die Limitierungen der traditionellen Pharmakotherapien und diagnostischer Verfahren zu umgehen. Der Forschungsschwerpunkt liegt dabei auf der gezielten Anreicherung (engl.: *targeted delivery*) oder der Freisetzung von Wirkstoffen im betroffenen Gewebe und dem effektiven Transport auf zellulärer Ebene.^[9] Bedingt durch ihre geringe Größe (1 - 500 nm) können nanoskalige Wirkstoffträgersysteme beispielsweise die Wasserlöslichkeit hydrophober Chemotherapeutika erhöhen oder sensitive Wirkstoffe, wie z.B. Proteine und Nukleinsäuren, vor aggressiven Umgebungsbedingungen schützen und in Zellen transportieren. Dadurch erhöhen sich die Bioverfügbarkeit und die therapeutische

Wirksamkeit dieser Wirkstoffe erheblich. Zudem kann durch eine geeignete Materialkomposition ein Wirkstoff mit konstanter Geschwindigkeit (engl.: *sustained release*) oder abhängig von Umgebungsbedingungen (z.B. dem pH-Wert) freigesetzt werden. Hierdurch können die Verabreichungsfrequenz sowie die Nebenwirkungen des Wirkstoffes deutlich erniedrigt werden. Wegen dieser vielversprechenden Eigenschaften haben in den letzten Jahren einige Wirkstoffformulierungen auf der Basis von Nanopartikeln (insbesondere Liposom-basierte und Polymer-Nanopartikel) Marktreife erlangt oder befinden sich in der klinischen Erprobungsphase.^[10]

In der vorliegenden Arbeit wird daher der Einsatz von Calciumphosphat-Polymer-Nanopartikeln als nanopartikuläres Trägersystem für Nukleinsäuren und Proteine vorgestellt, die biologische Wirksamkeit im Zellkulturexperiment untersucht und mit dem aktuellen Stand der Forschung verglichen.

1.2 Kompositmaterialien als Knochenersatz

Die Anwendung von Biomaterialien als Werkstoffe für temporäre oder permanente Implantate zur Rekonstruktion des humanen Knochens hat in den letzten Jahren in allen Bereichen der Chirurgie erheblich zugenommen.^[11] Die Herausforderung bei der Entwicklung solcher Biomaterialien besteht darin, den menschlichen Knochen, der in seinem Aufbau höchst komplex ist und eine hierarchische Anordnung besitzt, in seinen mechanischen, chemischen und biologischen Eigenschaften möglichst exakt nachzuahmen.^[12-14] Bis dato ist dies jedoch noch nicht realisierbar. Ein interessanter Ansatz, Knochendefekte, die beispielsweise durch Frakturen oder Tumore zustande kommen können, möglichst patientenspezifisch mit einem synthetischen Knochenersatzmaterial zu füllen, bietet das sog. *Rapid Prototyping* (RP). RP-Prozesse finden insbesondere in der regenerativen Medizin bei der Geweberekonstruktion und der Herstellung von Knochenersatzmaterialien Anwendung.^[15-17] Um die exakte Geometrie des Knochendefekts zu bestimmen, werden zunächst patientenspezifische Daten, z.B. mittels Computertomographie, gesammelt. Anhand dieser Daten wird anschließend das Knochenersatzmaterial mittels CAD-Technologie (engl. *computer aided design*) virtuell entworfen und als Schichtmodell gestaltet. Für die Herstellung eines mechanisch anspruchsvollen Werkstückes, wie humanem

Knochen, ist das selektive Lasersintern (SLS), ein pulverbasiertes dreidimensionales Druckverfahren, von besonderem Interesse, da hiermit mechanisch stabile Werkstücke mit nahezu beliebiger Geometrie realisiert werden können. Neben der mechanischen Stabilität und der patientenspezifischen Geometrie ist die Biokompatibilität eines neu entwickelten Knochenersatzmaterials von entscheidender Bedeutung, da das Material in direktem Knochenkontakt steht und möglichst gut in das umgebende Knochengewebe integriert werden muss. Synthetische Knochenersatzmaterialien auf der Basis von Polylactiden gehören zur Klasse der biodegradierbaren Biomaterialien und sind als Thermoplast zudem für den SLS-Prozess geeignet.^[18] Die Degradation des Knochenersatzes sollte mit der Knochenneubildung möglichst einhergehen, so dass bis zur vollständigen Ausheilung des Defektes die mechanische Stabilität des Implantates gegeben ist.^[19] Ein großer Nachteil der Knochenersatzmaterialien auf der Basis von Polylactid und seinen Copolymeren sind die sauren Degradationsprodukte, die im Extremfall zu Osteolyse und Azidose führen können.^[20-22] Eine mögliche Strategie, die sauren Degradationsprodukte abzupuffern, bietet der Zusatz von basischen Füllmaterialien wie Calciumcarbonat oder Calciumphosphat.^[23, 24] Auf diesen Materialien basierende Kompositmaterialien bieten folglich interessante Anwendungen im Bereich der Knochenersatzmaterialien und wurden in vorklinischen Studien bereits erfolgreich für den Knochenersatz verwendet.^[25] In der vorliegenden Arbeit wird daher eine Syntheseroute vorgestellt, die es ermöglicht, Mikrokompositpartikel auf der Basis von Polylactiden für den pulverbasierten SLS-Prozess mit einem hohen Anteil an anorganischem Füllmaterial herzustellen. Die aus diesem Mikrokompositpulver hergestellten Werkstücke werden schließlich hinsichtlich ihrer mechanischen und biologischen Eigenschaften untersucht und mit humanem Knochen verglichen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Biomaterialien

Ein Biomaterial ist laut des *American National Institute of Health* definiert als “Substanz oder eine Kombination von Substanzen, außer therapeutisch aktiven Substanzen (Wirkstoffe), synthetischen oder natürlichen Ursprungs, die für einen gewissen Zeitraum Gewebe-, Organ- oder Körperfunktionen unterstützen bzw. teilweise oder vollständig ersetzen, um die Lebensqualität eines Individuums aufrechtzuerhalten oder zu verbessern“ (übersetzt aus Referenz^[26]).

Biomaterialien sollen im Körper also Körperfunktionen ersetzen oder unterstützen, die in ihrer Funktion beeinträchtigt sind.^[27] Dabei werden an ein Biomaterial je nach Anwendung spezifische chemische, mechanische und biologische Anforderungen gestellt. Aus diesen Anforderungen resultiert die Biokompatibilität eines Biomaterials und umfasst die funktionale Ähnlichkeit zu körpereigenen Strukturen wie auch die biologische Verträglichkeit. Mechanische Anforderungen sind beispielsweise der feste Sitz einer Endoprothese oder die ausreichende Härte eines Knochenersatzmaterials.^[27] Das heißt, das Biomaterial muss in mechanischen Eigenschaften wie Härte, Elastizität oder Durchlässigkeit für verschiedene Substanzen dem zu ersetzenden biologischen Gewebe möglichst ähnlich sein.^[28] Chemische Anforderungen sind beispielsweise Degradationseigenschaften eines resorbierbaren Biomaterials, z.B. für den Knochenersatz. Damit das Biomaterial die o.g. mechanischen Eigenschaften für einen hinreichend langen Zeitraum beibehält, sollte die Degradationsgeschwindigkeit im Idealfall mit der Regenerationszeit des entsprechenden Gewebes übereinstimmen. Biologische Anforderungen sind z.B. das Ausbleiben einer Entzündung bzw. einer Immunreaktion und eine gute Osteokonduktivität eines Knochenersatzmaterials.

Die Biokompatibilität eines Biomaterials ist also immer ein Kompromiss aus den chemischen, mechanischen und biologischen Eigenschaften und für jeden Anwendungszweck neu zu beurteilen. Ein perfektes Biomaterial, das sowohl den mechanischen und chemischen als auch den biologischen Anforderungen des zu ersetzenden Gewebes auf Dauer entspricht, gibt es folglich im Allgemeinen nicht.^[27, 28]

2.1.1 Knochenersatzmaterialien

Biomaterialien für den Knochenersatz, sog. Knochenersatzmaterialien, werden in der Medizin dazu eingesetzt, fehlendes Knochenvolumen vorübergehend oder permanent zu ersetzen und ggf. zu regenerieren. Gemäß der o.g. Definition für Biomaterialien soll das Knochenersatzmaterial dem natürlichen Knochen dabei in seinen mechanischen, chemischen und biologischen Eigenschaften möglichst nahe kommen und eine gute Biokompatibilität besitzen.^[27, 29] Dafür werden derzeit im Wesentlichen (Bio-)Polymere, Keramiken, Metalle und Kompositmaterialien aus diesen Stoffen eingesetzt. Nach Rentsch *et al.* lassen sich Knochenersatzmaterialien neben der klassischen Unterteilung in autologe (patienteneigene Knochen), allogene (Knochen von einem Spender), xenogene (tierischen Ursprungs) und alloplastische Knochenersatzmaterialien (physikalisch oder chemisch behandelte allogene oder xenogene Gewebe), auch nach der Zusammensetzung der Materialien einteilen. Dabei wird zwischen organisch-biologischen Materialien (z.B. Collagen), organisch-synthetischen Materialien (z.B. synthetische Polymere wie Polylactide oder Polymethylmethacrylat), anorganisch-biologischen Materialien (z.B. Hydroxylapatit aus Knochen oder Korallen), anorganisch-synthetischen Materialien (z.B. synthetischer Hydroxylapatit oder β -Tricalciumphosphat) und Kompositmaterialien aus den o.g. Materialien unterschieden.^[29] Zusätzlich klassifizieren Rentsch *et al.* die Knochenersatzmaterialien nach ihrer biologischen Wertigkeit in osteokonduktive, osteoinduktive und osteogene Materialien. Osteokonduktive Materialien dienen im Wesentlichen nur als Leitstruktur zum Einwachsen von neu gebildetem Knochen. Osteoinduktive Materialien stimulieren die Differenzierung der Zellen (meistens undifferenzierte mesenchymale Stammzellen) zu Osteoblasten und somit zur Knochenneubildung. Osteogene Materialien besitzen hingegen schon lebende Zellen, die zu knochenbildenden Zellen differenzieren können und somit

eigenständig in der Lage sind, neue Knochensubstanz zu produzieren (z.B. autologe Knochentransplantate). Autologes Knochenersatzmaterial, also patienteneigener Knochen, der an einer Stelle des Körpers entnommen wird und an einer anderen Stelle wieder implantiert wird, ist sowohl osteogen als auch osteokonduktiv und osteoinduktiv und gilt daher bis heute als Goldstandard der Knochenersatzmaterialien.^[27, 29-32] Körpereigener Knochen ist jedoch in seiner Verfügbarkeit limitiert und die Reimplantation immer mit zusätzlichen Operationen verbunden. Bei allogenen und xenogenen Transplantaten besteht das Risiko einer Krankheitsübertragung durch den Spender oder einer Immunantwort. Dies gilt in geringerem Maße auch für alloplastische Knochenersatzmaterialien, die nach der chemischen oder physikalischen Behandlung (z.B. nach dem Abbrand des organischen Anteils) theoretisch nur noch die anorganische, spongiöse Leitstruktur aufweisen.^[27-29] Um diese Limitierungen zu umgehen, werden derzeit vor allem synthetische Kompositmaterialien aus organischen und anorganischen Materialien erforscht, die hinreichend mechanisch stabil sind und zudem eine gute Bioverträglichkeit aufweisen.^[33-36] Besonders interessant sind hier Materialien, die es erlauben, patientenspezifische Geometrien, z.B. über sog. *Rapid Prototyping Prozesse*, zu formen, und deren Abbaugeschwindigkeit an die Knochen-Resynthese angepasst ist.

2.2 Biodegradierbare Polyester

Polymere sind eine wichtige Werkstoffklasse im Bereich der Biomaterialien und werden seit den 1960er Jahren klinisch eingesetzt.^[27, 37] Für medizinische Zwecke wird hier im Wesentlichen zwischen nicht degradierbaren Polymeren wie Polyethylen (PE, z.B. für künstliche Gelenkpfannnen), Polyetheretherketon (PEEK, z.B. für künstliche Bänder), Polymethylmethacrylat (PMMA, z.B. als Knochenzement), Polytetrafluorethylen (PTFE, z.B. für künstliche Adern) und biodegradierbaren Polymeren unterschieden. Die wichtigste Klasse der biodegradierbaren Polymere sind die aliphatischen Polyester auf der Basis von Glycol- und Milchsäure.^[27, 38, 39] Diese befinden sich derzeit als Nahtmaterial, Fixierschrauben, Gerüst für die Osteosynthese und als Wirkstoffträger für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung im klinischen Einsatz.^[38-40]

Ein Vorteil der aliphatischen Polyester liegt in der Vielfalt der chemischen Zusammensetzung und der Modifizierbarkeit der Mikrostruktur. Durch Variation der Comonomer-Verhältnisse der verschiedenen Stereoisomere der Milchsäure (*D*-Milchsäure und *L*-Milchsäure) bzw. des Lactids (*D*-Lactid und *L*-Lactid), die großen Einfluss auf die physikalischen Materialeigenschaften (mechanische Eigenschaften, Degradationszeit) haben, erhält man eine Reihe von Kombinationsmöglichkeiten mit den unterschiedlichsten Zusammensetzungen der resultierenden Polylactide (siehe Abbildung 1). Kombiniert man beispielsweise das racemische Gemisch aus *D*-Lactid und *L*-Lactid, so entsteht bei einer statistischen 50:50 Verteilung das amorphe, weiche und schnell degradierbare Poly(*D,L*-lactid) mit einer ataktischen, d.h. einer zufälligen, Anordnung der Seitenketten. Die Polymerisation von reinem *L*-Lactid führt hingegen zum kristallinen Poly(*L*-lactid) mit einer isotaktischen, d.h. regelmäßigen in die gleiche Richtung erfolgenden Anordnung der Seitenketten.

Block-Copolymere sind des Weiteren durch stereoselektive Polymerisation von racemischen Gemischen aus *L*-Lactid und *D*-Lactid oder aus der Kombination von Poly(*L*-lactid) und dem amorphen Poly(*D,L*-lactid) zugänglich. Daraus entsteht das teilkristalline Block-Copolymer Poly(*L*-lactid-*co-D,L*-lactid) mit Mischeigenschaften aus dem kristallinen Poly(*L*-lactid) und des amorphen Poly(*D,L*-lactid). Ein Material mit der allgemeinen Zusammensetzung „Polylactid“ bietet somit schon eine Reihe an Kombinationsmöglichkeiten, die noch erweitert

werden, wenn Copolymere aus Polyglycolid und Polylactid (Poly(lactid-co-glycolid), PLGA) betrachtet werden. Die Variationsbreite der Polylactide wird folglich noch durch Glycolid-Copolymere in verschiedenen Zusammensetzungen und Monomerabfolgen erweitert. So wird ein Copolymer, bestehend aus Polyglycolsäure und Poly(*L*-lactid), als Poly(*L*-lactid-co-glycolid) (PLLGA) und ein Copolymer, bestehend aus Polyglycolsäure und Poly(*D,L*-lactid), als Poly(*D,L*-lactid-co-glycolid) (PDLLGA bzw. PLGA) bezeichnet. Die Monomeranteile werden schließlich als Zahlen angegeben. Ein Copolymer, bestehend aus 70 Mol-% Poly(*L*-lactid) und 30 Mol-% Polyglycolsäure wird folglich als PLLGA (70:30) bezeichnet.^[27]

Die Synthese der Polyester erfolgt üblicherweise über ringöffnende Polymerisation von Lactid oder zyklischen Di-Estern aus Lactiden und Glycoliden (siehe Abbildung 1). Als Katalysator für die industrielle Herstellung wird Zinn(II)-2-ethylhexanoat ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), ein kommerziell erhältlicher, leicht zu handhabender und in der Monomerschmelze gut löslicher Komplex, verwendet.^[41, 42] Zudem ist $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ von der Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (engl.: *Food and Drug Administration*, FDA) für die Polylactidherstellung zugelassen.^[41]

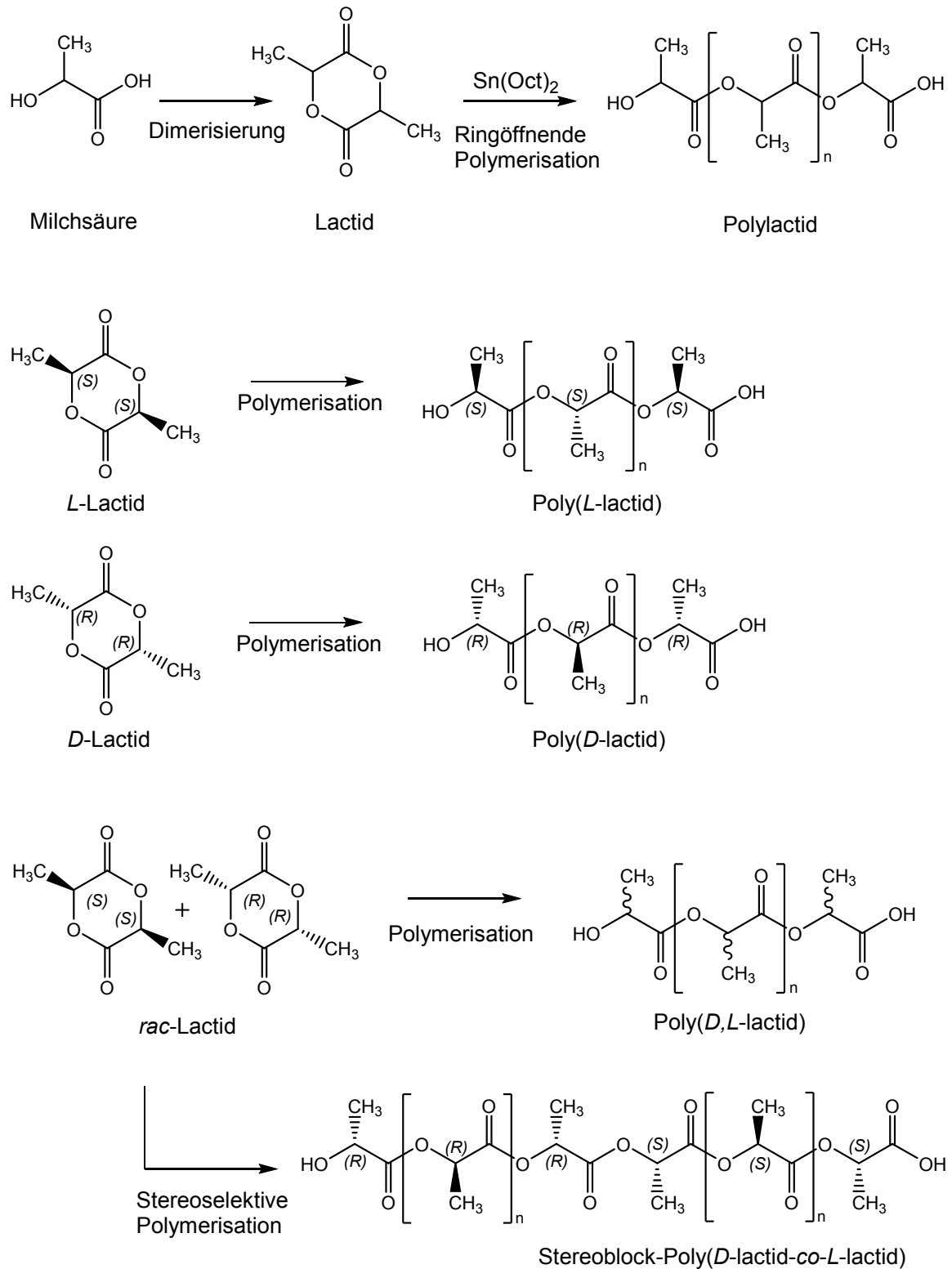


Abbildung 1: Schematischer Reaktionsverlauf der ringöffnenden Polymerisation des zyklischen Dimers der Milchsäure (Lactid) zum Polylactid mit Zinn(II)-2-ethylhexanoat als Katalysator sowie einige der über diesen Reaktionsmechanismus zugängliche Sequenzen des Polylactids.

Die Biodegradierbarkeit von Polylactiden und von Glycolid-Copolymeren beruht auf der hydrolytischen Spaltung der Esterbindungen im Polymer-Rückgrat. Dabei werden die Monomere (Milchsäure bzw. Glycolsäure) frei, welche im Körper verstoffwechselt werden können. Milchsäure wird beispielsweise in der Leber unter Beteiligung der Lactatdehydrogenase (LDH) zu Pyruvat oxidiert, so dass sie dem Stoffwechsel zugänglich gemacht wird (z.B. im Citratzyklus).^[43]

Die Esterhydrolyse verläuft Säure- und Base-katalysiert,^[44] so dass der pH-Wert einen großen Einfluss auf das Degradationsverhalten des Polymers besitzt. Da Wasser und Körperflüssigkeiten schneller in ein makroskopisches Material auf Polylactid-Basis hinein diffundieren als das Polymer an der Oberfläche degradiert, degradieren Polylactide vorwiegend in der gesamten *bulk*-Phase, d.h. in der Volumenphase. Auch wenn die bei der Degradation freigesetzten Monomere physiologisch unbedenklich sind, ist ihr saurer Charakter bei der Verwendung als Knochenersatzmaterial problematisch. Bei Knochenkontakt können sich die sauren Degradationsprodukte im Implantatinneren beispielsweise anreichern und somit die weitere Degradation von innen heraus katalysieren, so dass Bereiche mit unterschiedlicher mechanischer Stabilität im Implantat entstehen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert bei der Degradation stark absinkt und die Degradation so zu Osteolyse und Azidose führen kann.^[23, 24, 27]

Um das Problem der sauren Degradation zu verhindern, wurden in der Literatur bereits einige Kompositmaterialien auf der Basis von Polyestern und anorganischen Füllstoffen beschrieben. Die anorganischen Füllstoffe dienen dabei als basische Puffersubstanz und zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften. Linhart *et al.* untersuchten pH-stabilisierte Polyglycolsäure-Komposite (u.a. mit Carbonat-Apatit) im Zellkulturexperiment und bestätigten diese Ergebnisse mit *in vitro* pH-Untersuchungen.^[31, 45] Dabei stellte sich heraus, dass Calciumphosphat alleine nicht ausreicht, um die saure Degradation der Polyglycolsäure zu puffern. Es zeigt sich, dass der Carbonatanteil im Carbonatapatit für die pH-Kompensation verantwortlich ist.^[23, 24] Dieses Prinzip der pH-Kompensation wurde in zahlreichen Veröffentlichungen untersucht und führte u.a. zu Implantaten, bestehend aus Kompositen von Poly(*D,L*-lactid) (PDLLA), Poly(*L*-lactid) (PLLA) und Poly(*L*-lactid-co-glycolid) (PLGA) als organischem Bestandteil und Hydroxylapatit-Nanopartikeln, β -Tricalcium-

phosphat-Mikropartikeln, Carbonatapatit sowie Calciumcarbonat als anorganischem Bestandteil und verschiedenen Mischungen aus den genannten anorganischen Bestandteilen.^[46]

In diesen Studien zeigte sich auch, dass durch die Zugabe der anorganischen Füllstoffe die mechanischen Eigenschaften stark verbessert werden konnten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch die Zugabe von Carbonatapatit oder Calciumcarbonat die saure Degradation verhindert wurde, so dass die Kombination dieser Materialien zu einem synergetischen Effekt führte. Die Kombination von Polylactiden und Calciumphosphat bzw. Calciumcarbonat wurde erfolgreich für die Herstellung von biodegradierbaren Schädelimplantaten eingesetzt, die auch im Tierversuch *in vivo* sehr gute Ergebnisse zeigten.^[23, 24, 30]

Aber nicht nur die Verwendung von aliphatischen Polyestern als Knochenersatzmaterial ist von Interesse. Auch als Wirkstoffträgersystem besitzen diese Materialien einige interessante Eigenschaften. PLGA-Nanopartikel werden beispielsweise seit einigen Jahren in der biomedizinischen Forschung als nanopartikulärer Wirkstoffträger für hydrophobe und hydrophile, biologische Wirkstoffklassen wie Proteinen und Nukleinsäuren eingesetzt.^[47-52] Dabei werden die Wirkstoffe in der Polymermatrix eingeschlossen und vor der äußeren Umgebung geschützt. Aufgrund ihrer Größe können die Nanopartikel (siehe Abschnitt 2.5.1) über Endozytose von Zellen aufgenommen werden. Durch hydrolytische Spaltung der Esterbindungen in der Polymerkette degradieren die Nanopartikel schließlich und setzen die Wirkstoffe kontrolliert über einen Zeitraum von einigen Wochen frei, je nach verwendetem Polylactid.^[52]

2.3 Calciumphosphate

Calciumphosphat ist die anorganische Komponente des menschlichen Hartgewebes wie den Knochen, Zähnen und Sehnen, und liegt dort hauptsächlich als nanopartikulärer, carbonathaltiger Hydroxylapatit (außer im Zahnschmelz) vor.^[12, 27, 53, 54] Calciumphosphat-basierte Biomaterialien werden daher häufig als Knochenersatzmaterialien verwendet und sind für ihre gute Biokompatibilität bekannt.^[27]

Durch die Kombination von Calcium und Phosphat gibt es eine Reihe von stöchiometrisch unterschiedlich zusammengesetzten Calciumphosphaten. Je

nach Lage des Protolysegleichgewichts kann das Orthophosphat (PO_4^{3-}) als konjugierte Base der Phosphorsäure (H_3PO_4) entweder als Hydrogenphosphat- (HPO_4^{2-}) oder als Dihydrogenphosphat-Ionen (H_2PO_4^-) in wässriger Lösung vorliegen. Durch Zugabe eines Calcium-Salzes (z.B. Calciumchlorid) können alle drei o.g. Phosphat-Ionen mit den Ca^{2+} -Ionen Salze bilden. Diese Salze sind bei neutralem und alkalischem pH-Wert schwer löslich, während sie unter sauren Bedingungen löslich sind.^[27]

Ein wichtiges Kriterium bei der Benennung der Calciumphosphate ist das molare Verhältnis von Calcium zu Phosphor, welches von 0,5 im Monocalciumphosphat-Monohydrat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MCPM) bis zu 2,0 im Tetracalciumphosphat ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$, TTCP) reicht. Im Allgemeinen nimmt die Wasserlöslichkeit mit größer werdendem Verhältnis von Calcium zu Phosphor ab. MCPM hat beispielsweise eine so hohe Wasserlöslichkeit, dass es keine biologische Relevanz besitzt und im menschlichen Hartgewebe nicht beobachtet wird. Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}$, HAP) ist hingegen mit einem Verhältnis von Calcium zu Phosphat von 1,67 das in wässrigen Medien stabilste und damit bei neutralem pH-Wert am wenigsten lösliche Calciumphosphat.

In biologischen Systemen wie dem Knochen kommt HAP jedoch nicht phasenrein vor. So kann Hydrogenphosphat (HPO_4^{2-}) beispielsweise in das Gitter mit eingebaut werden und somit Phosphat-Ionen substituieren. Aber auch andere Ionen wie Na^+ , K^+ , Mg^{2+} oder Sr^{2+} können Ca^{2+} -Ionen ersetzen, während Carbonat- (CO_3^{2-}) typischerweise PO_4^{3-} -Ionen ersetzen. In biologischen Apatiten kommen typischerweise einige Prozent Carbonat-Ionen vor, so dass diese auch Carbonatapatite genannt werden.^[27, 53, 55, 56]

In ihrer nanopartikulären Form können Calciumphosphate zudem gut von Zellen über Endozytose-Mechanismen^[57] aufgenommen werden (siehe Abschnitt 2.5.1) und eignen sich daher als Wirkstoffträgersystem für ein breites Wirkungsspektrum.^[58-64] Die Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel erfolgt dabei zumeist in wässriger Lösung über eine kontrollierte Fällungsreaktion aus Calcium- und Phosphatsalzen.^[57, 64-69] Die daraus resultierenden Calciumphosphat-Nanopartikel bestehen aus einem Calciumphosphat-Kern, der mit einer Polyelektrolyt-Hülle stabilisiert wird. Nicht stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel sind kolloidal instabil und neigen zur Agglomeration.

Von besonderem Interesse sind Nukleinsäure-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel für die Transfektion von Zellen, die erstmals von Graham *et al.* (siehe Abschnitt 2.5.2) beschrieben und in folgenden Studien weiter entwickelt wurden.^[70-73] Nukleinsäuren können über das negativ geladene Phosphatrückgrat mit den Calcium-Ionen der Nanopartikel wechselwirken und entweder als Keime für die Fällung der Calciumphosphat-Nanopartikel dienen oder an der Oberfläche der Calciumphosphat-Nanopartikel adsorbieren und diese dabei elektrosterisch stabilisieren (siehe Abschnitt 2.4.1). Dabei dienen die Nukleinsäuren sowohl als Polyelektrolyt zur Stabilisierung der Nanopartikel als auch als therapeutisch wirksame Substanz für die Gentherapie und ermöglichen somit eine Nanopartikel-Synthese ohne weitere Zusätze.

2.4 Kolloidchemische Grundlagen

Kolloide sind kleine Partikel oder Tröpfchen mit einer Größe von ca. 1 - 500 nm, die fein verteilt in einer kontinuierlichen Phase, dem sog. Dispersionsmittel, vorliegen.^[74] Staudinger unterscheidet zwischen drei Klassen kolloidaler Systeme, den Dispersionskolloiden, den Lösungen makromolekularer Substanzen und den Assoziationskolloiden. Dispersionskolloide sind Kolloide, die im Dispersionsmittel unlöslich sind und die sich aus fast jedem festen, flüssigen oder gasförmigen Stoff herstellen lassen, sofern der Stoff unlöslich im Dispersionsmedium ist. Thermodynamisch sind Dispersionskolloide folglich instabil und tendieren zur Auflösung oder Agglomeration unter Ausbildung einer separierten, makroskopischen Phase. Molekülkolloide sind Lösungen makromolekularer Substanzen. Die Kolloidgröße wird hier durch die Größe und Struktur des gelösten Makromoleküls bestimmt. Beispiele hierfür sind Proteine, Polysaccharide oder auch Kautschuk. Assoziationskolloide sind Kolloide, die von amphiphilen Substanzen wie z.B. Tensiden gebildet werden. Oberhalb einer bestimmten Stoffkonzentration, der sog. kritischen Mizellenbildungskonzentration (engl.: *critical micelle concentration*, CMC), bilden sich diese Assoziate spontan (Selbstorganisation) und sind thermodynamisch stabil.^[74] Ostwald teilte kolloid-disperse Systeme nach dem Aggregatzustand des Kolloids und des Dispersionsmediums ein. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Kombinationen dargestellt.

Tabelle 1: Einteilung kolloidaler Systeme nach Ostwald (entnommen aus^[75]).

Bezeichnung	Kolloid	Dispersionsmittel	Beispiele
Feste Sole	Fest	Fest	Goldrubinglas
Suspensionen	Fest	Flüssig	Kolloide in Gewässern
Feste Aerosole	Fest	Gas	Tabakrauch, Staub
Feste Emulsionen	Flüssig	Fest	Opal, Perlen
Emulsionen	Flüssig	Flüssig	Milch, Mayonnaise
Flüssige Aerosole	Flüssig	Gas	Nebel
Feste Schäume	Gas	Fest	Styropor
Flüssige Schäume	Gas	Flüssig	Seifenschaum

2.4.1 DLVO-Theorie und Zeta-Potential

Die DLVO-Theorie, benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek, beschreibt die Stabilität von Dispersionskolloiden. Sie besagt, dass die Stabilität eines kolloidalen Systems durch zwei Arten von Wechselwirkungen geprägt ist. Zum einen wird die kolloidale Stabilität durch attraktive van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Kolloiden beeinflusst. Zum anderen wird sie durch repulsive sterische und/oder elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst, die durch sterisch anspruchsvolle Liganden oder durch Oberflächenladungen der Kolloide induziert werden. Betrachtet man den Ladungsaufbau eines Kolloids (siehe Abbildung 2), erkennt man, dass sich Ladungsträger entgegengesetzter Ladung an der geladenen Grenzfläche anlagern und eine elektrische Doppelschicht ausgebildet wird. Diese Schicht wird auch Sternschicht genannt. Um diese Doppelschicht lagern sich in wässrigen Kolloiddispersionen wiederum Ladungen entgegengesetzter Ladung an, um das Elektro-neutralisationsprinzip zu gewährleisten. Diese Schicht wird diffuse Schicht genannt. Die Konzentration der entgegengesetzt geladenen Ladungsträger ist an

der Grenzfläche vom Kolloid zur wässrigen Phase also wesentlich größer als im gesamten Volumen der wässrigen Phase, so dass die Änderung des Potentials mit dem Abstand zur Kolloidoberfläche zunächst linear verläuft (durch die Anreicherung der Ladungsträger an der Kolloidoberfläche, der sog. Sternschicht), dann jedoch exponentiell gegen den Wert Null geht, da sich die Konzentration entgegengesetzter Ladungsträger in der diffusen Schicht mit zunehmenden Abstand von der Kolloidoberfläche der Konzentration im gesamten Volumen annähert (siehe Abbildung 2). Wird die Bewegung eines solchen Teilchens durch die kontinuierliche Phase betrachtet, so ergibt sich mit zunehmenden Abstand von der Kolloidoberfläche eine Scherfläche zwischen der diffusen Doppelschicht und den Ladungsträgern der kontinuierlichen Phase, die sich nicht mitbewegen. Die Potentialdifferenz an dieser hydrodynamischen Scherfläche wird Zeta-Potential genannt und ist ein Maß für die Ladung eines Kolloids in wässrigen Medien (siehe Abbildung 2). Das Zeta-Potential kann über die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung bestimmt werden. Kolloidale Dispersionen mit einem Betrag des Zeta-Potentials von mehr als ± 30 mV gelten als stabil.^[76]

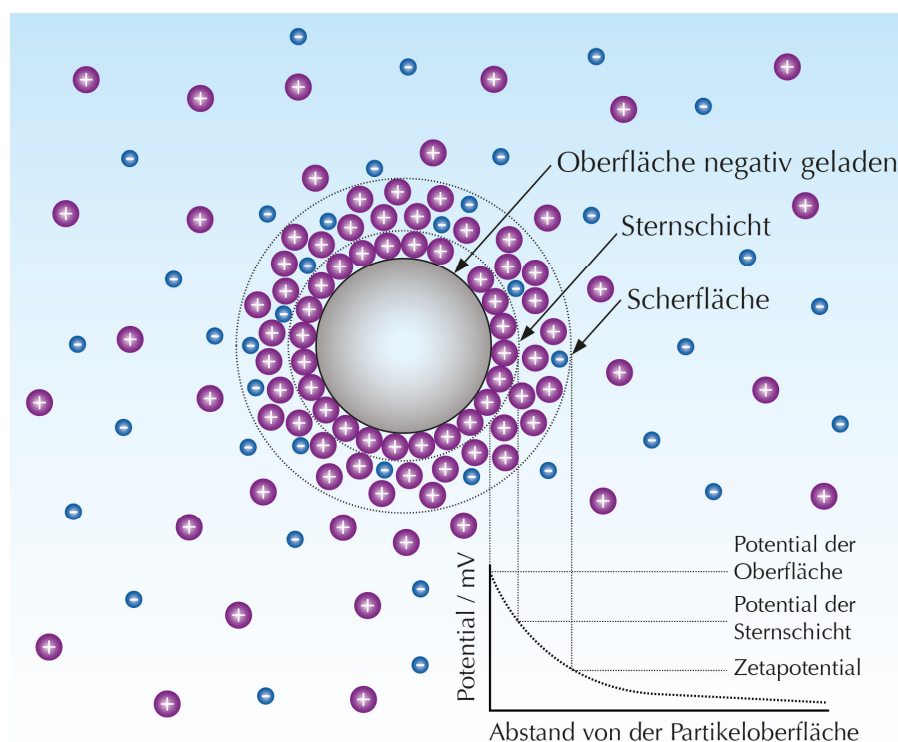


Abbildung 2: Schematische Darstellung zur Definition der elektrischen Doppelschicht und des Zeta-Potentials.

Die Ladung, welche jedes Kolloid erfährt, wirkt als repulsive elektrostatische Anziehungskraft, so dass die Stabilität einer kolloidalen Dispersion auch in Potential-Abstandsfunktionen verdeutlicht werden kann (siehe Abbildung 3).^[77]

In diesen Potential-Abstandsfunktionen wird die Änderung der freien Energie (ΔG) eines Systems gegen den Abstand der Kolloide aufgetragen und der Einfluss durch attraktive van-der-Waals-Wechselwirkungen (i) und durch repulsive sterische und/oder elektrostatische Wechselwirkungen (ii) betrachtet. Durch die Addition der Einzelpotentiale (i) und (ii) erhält man die Gesamtenergie (iii). Bei Werten oberhalb der Abzisse erfahren die Kolloide folglich repulsive und unterhalb der Abzisse attraktive Kräfte.

In Abbildung 3 sind Beispiele für unterschiedlich stabile kolloidale Systeme gezeigt. Abbildung 3A zeigt ein kolloidal stabiles System mit großen repulsiven Kräften. Die diffuse elektronische Doppelschicht ist in diesem System stark ausgeprägt, so dass die repulsiven elektrostatischen Kräfte den attraktiven van-der-Waals-Wechselwirkungen überlegen sind. Nähern sich die Kolloide an, so müssen sie eine sehr hohe Energiebarriere (das primäre Maximum P) überwinden, bis sie schließlich irreversibel agglomerieren (am primären Minimum M_1). Senkt man diese Energiebarriere durch reduzierte repulsive Kräfte herab, so können die Kolloide leicht irreversibel im primären Minimum agglomerieren (Abbildung 3B). Dies entspricht einem kolloidal instabilen System. In Abbildung 3C ist die Energiebarriere nicht vorhanden und die Potentialkurve verläuft unterhalb der Abzisse. D.h. das System erfährt nur attraktive Wechselwirkungen und repräsentiert ein höchst instabiles System ohne diffuse Doppelschicht. Abbildung 3D zeigt ein teilkoaguliertes kolloidales System, das zwar eine relativ hohe Energiebarriere P besitzt, aber zusätzlich ein sekundäres Minimum (M_2) besitzt. Für kolloidale Systeme, die sich annähern und dieses sekundäre Minimum durchlaufen, wird oftmals eine reversible Agglomeration und eine erhöhte Viskosität beobachtet.^[74, 77]

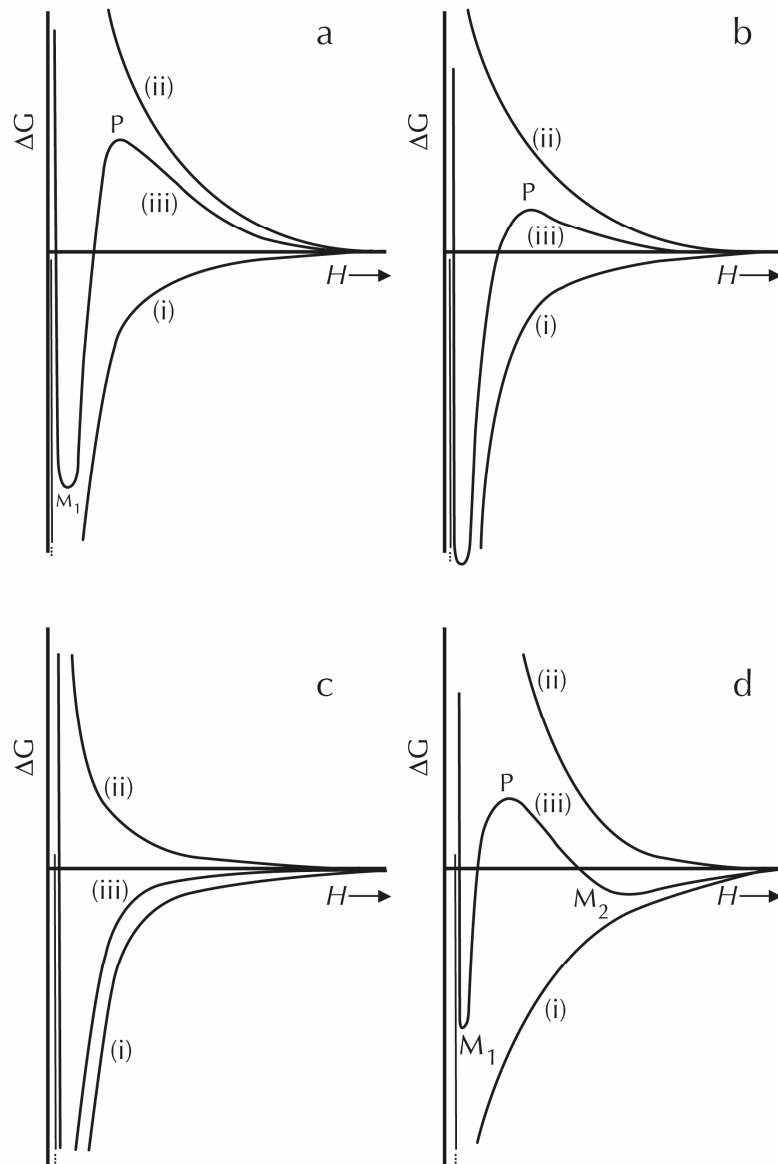


Abbildung 3: Zusammenhang zwischen freier Energie eines Systems (ΔG) und Abstand der kolloidalen Teilchen untereinander zur Illustration der DLVO-Theorie. Berücksichtigt werden anziehende Kräfte (i), repulsive elektrostatische Kräfte (ii) und die resultierende Gesamtenergie (iii). Abbildung nach Referenz^[77].

Kolloidale Systeme, die zur Koagulation neigen, wie z.B. Calciumphosphat-Nanopartikel, können mit (Bio-)Polymeren wie Chitosan,^[78, 79] Polylactiden^[48, 50, 51] oder auch Nukleinsäuren^[57, 65, 80] funktionalisiert und dadurch stabilisiert werden. Prinzipiell sind durch die Funktionalisierung mit (Bio-)Polymeren drei Arten der Stabilisierung möglich. Zum einen können Nanopartikel rein sterisch stabilisiert werden, indem eine äußere Polymerschicht die Partikel vor der Agglomeration

schützt. Die elektrostatische Stabilisierung wurde bereits im Rahmen der DLVO-Theorie und der Beschreibung des Zeta-Potentials beschrieben. Die dritte Möglichkeit der Stabilisierung ist die elektrosterische Stabilisierung, die sowohl sterischer, als auch elektrostatischer Natur ist. Hierbei werden die Nanopartikel mit geladenen (Bio-)Polymeren funktionalisiert, die wegen ihres sterischen Anspruchs zum einen die Nanopartikel räumlich vor Agglomeration schützen, zum anderen durch ihre Ladung den Partikeln repulsive elektrostatische Kräfte verleihen. Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung ist die Verminderungsstabilisierung, bei der sehr hohe Polymerkonzentration eingesetzt werden, so dass die Kolloide durch freie Polymermoleküle zwischen den einzelnen Kolloiden getrennt werden. Eine qualitative Beschreibung dieser Stabilisierung ist in Abbildung 4 gezeigt. Hier wird deutlich, dass es sehr wichtig ist, eine angemessene Polymerkonzentration zu verwenden, da es sonst zu der sogenannten Brückenflockung oder der Verminderungsflockung kommen kann.

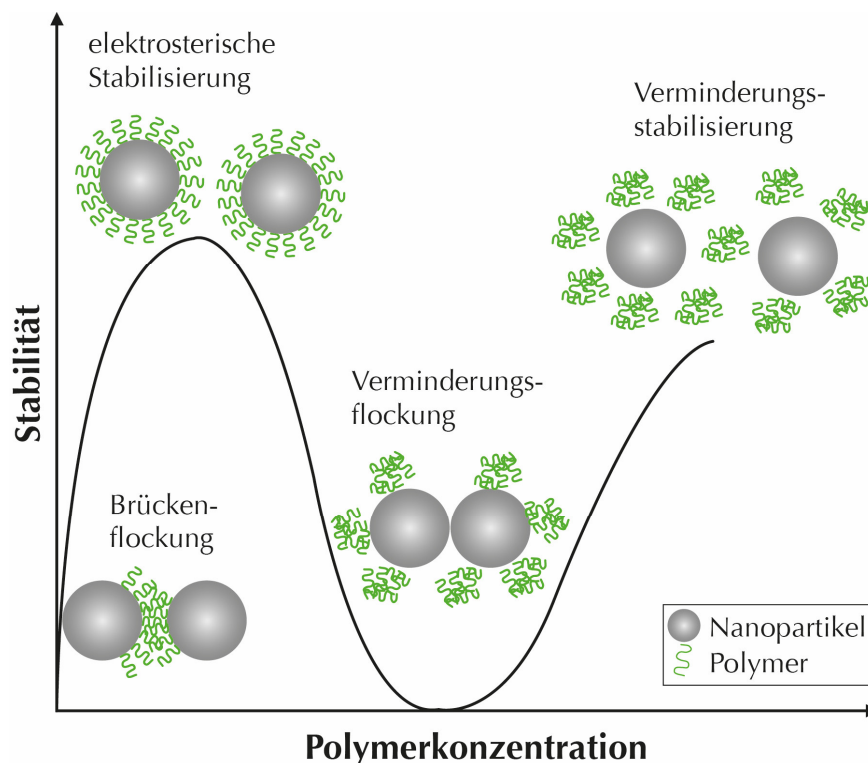


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Polymer-stabilisierten Nanopartikeln. Abbildung erstellt nach Referenz^[81].

2.5 Zellbiologische Grundlagen

2.5.1 Endozytose von Nanopartikeln

Die Endozytose ist ein fundamentaler Prozess eukaryotischer Zellen, um Moleküle bzw. Makromoleküle durch Deformation der Zellmembran zu internalisieren. Dadurch findet ein Stoffaustausch zwischen den Zellen und ihrer Umgebung statt. Es hat sich herausgestellt, dass Nanopartikel, die sich im extrazellulären Raum befinden, abhängig von der Größe, Form, Oberflächenbeschaffenheit/Oberflächenladung und Härte der Nanomaterialien über unterschiedliche Endozytose-Mechanismen in das Zellinnere aufgenommen werden.^[82]

Daher sind das Verständnis und die Aufklärung der Endozytosemechanismen sowie der intrazelluläre Verbleib von Nanopartikeln ein wichtiger Forschungsschwerpunkt für die Verwendung von Nanopartikeln als Wirkstoffträger in der Nanomedizin.

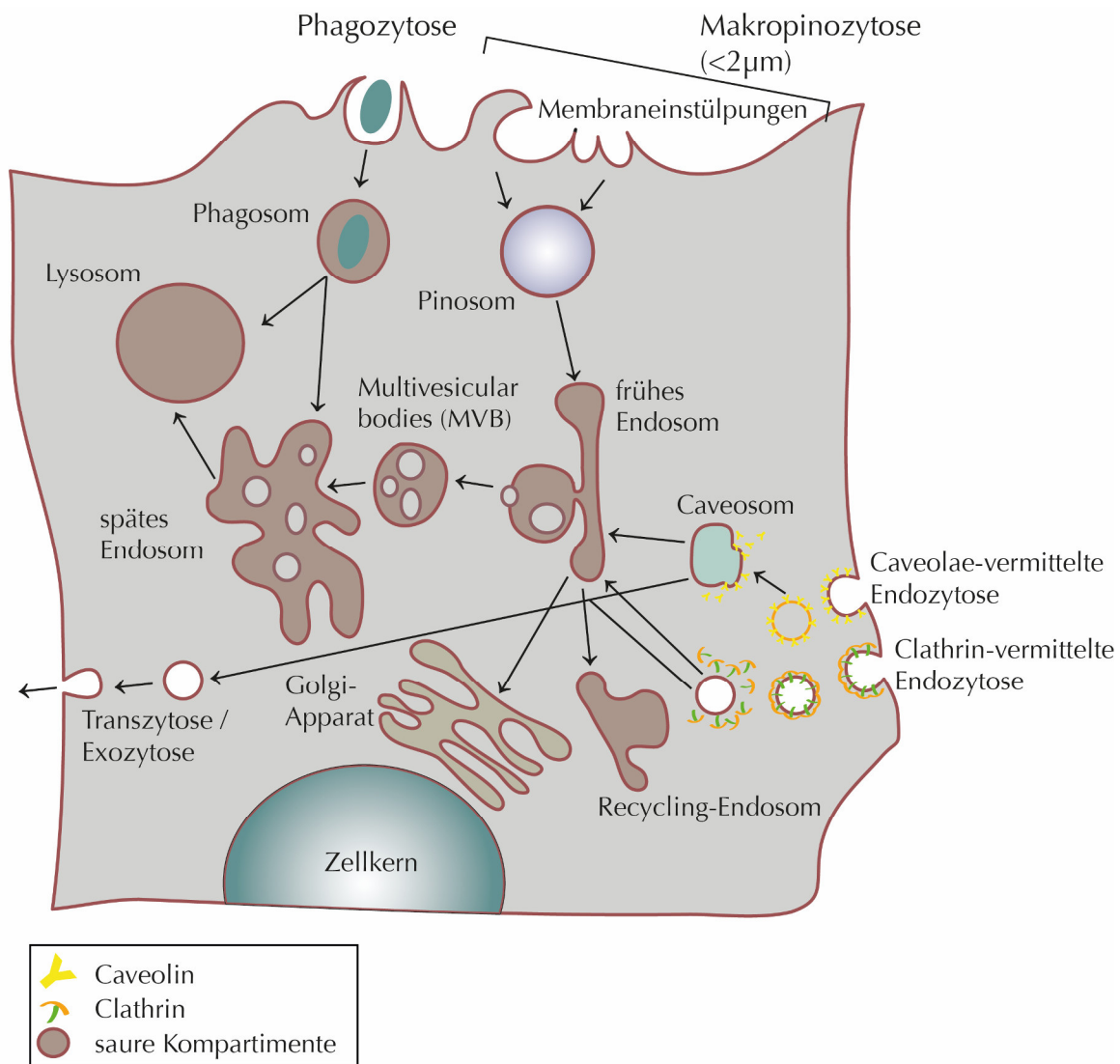


Abbildung 5: Schematische Darstellung der extrazellulären Aufnahme durch verschiedene Endozytose-Mechanismen einer eukaryotischen Zelle.^[83]

Die traditionelle Klassifizierung der Endozytosemechanismen erfolgt nach der Größe der aufgenommenen Teilchen in die zwei Hauptkategorien Phagozytose und Pinozytose. Während die Phagozytose charakteristisch für Phagozyten ist, um größere Partikel wie z.B. Mikroorganismen oder apoptotische Zellen zu eliminieren, ist die Pinozytose in allen eukaryotischen Zellen zu finden. Die Pinozytose wird abhängig von den beim Aufnahmeprozess beteiligten Proteinen und Lipiden in weitere Unterkategorien unterteilt (Abbildung 5). Hierbei wird zwischen Clathrin-vermittelten und Clathrin-unabhängigen Endozytosemechanismen unterschieden.^[82-84]

Die Clathrin-abhängige bzw. Clathrin-vermittelte Endozytose (engl.: *Clathrin-mediated endocytosis*, CME) ist der am weitesten verbreitete Endozytosemechanismus und kommt in allen Säugetierzellen vor. Über diesen Aufnahme-Mechanismus werden essentielle Nährstoffe wie Cholesterin, komplexiert von Lipoproteinen geringerer Dichte (engl.: *Low density lipoprotein*, LDL), oder Eisen, komplexiert von Transferrin, in die Zelle eingeschleust.^[84-86] Auch bei der Aufnahme von Nanopartikeln spielt die CME eine wichtige Rolle. So wurde die CME als dominanter Aufnahmemechanismus z.B. für PLGA-^[87] Silica-^[88] und Chitosan-Nanopartikel^[89] beschrieben. Im Folgenden wird daher der Clathrin-abhängige Endozytosemechanismus detailliert beschrieben.

Mechanistisch werden zunächst Adaptorproteinkomplexe zur Zellmembran rekrutiert, wo diese Clathrin binden und so die Anreicherung von Clathrin an der Zellmembran induzieren. Anschließend polymerisieren Clathrin-Triskelione an der Zellmembran durch Beteiligung des zytosolischen Proteins Clathrin-1 und bilden eine zweidimensionale Struktur, bestehend aus Hexagonen und Pentagonen. Dadurch wird die Zellmembran deformiert, und es bilden sich die sogenannten Clathrin-Vesikel (engl.: *Clathrin-coated vesicles*, CCV). Diese Vesikel besitzen eine Größe von ca. 120 nm und werden im nächsten Schritt von der Zellmembran durch die GTPase Dynamin abgeschnürt.^[90] Verschiedene Proteine verbinden das CCV schließlich mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle, so dass es durch Aktin schließlich ins Innere der Zelle bewegt werden kann.^[91] Im Inneren der Zelle wird die Clathrin-Beschichtung der CCV schließlich abgestreift, und die Vesikel fusionieren zu Endosomen, die im Weiteren zu Lysosomen dirigiert werden (siehe Abbildung 6).

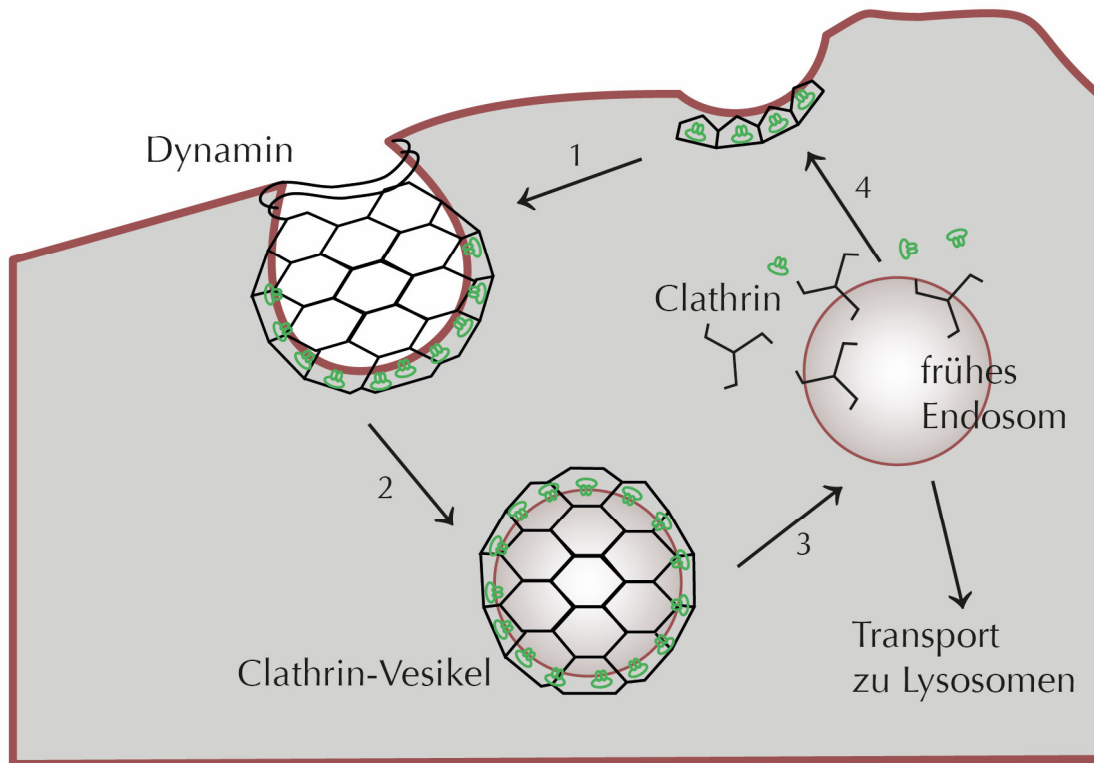


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Clathrin-vermittelten Endozytosemechanismus.^[84]

Nanopartikel können neben der Clathrin-vermittelten Endozytose auch über Clathrin-unabhängige Endozytosemechanismen in das Zellinnere aufgenommen werden. Für das Einbringen von Proteinen und Nukleinsäuren ist die Caveolae-vermittelte Endozytose von besonderem Interesse, da durch die Formation von Caveosomen, der Verbleib in lysosomalen Kompartimenten und die resultierende lysosomale Degradation umgangen werden kann (siehe Abbildung 5).^[84, 92-94] Als Spezialfall der Clathrin-unabhängigen Endozytose kann die Macropinozytose angesehen werden, da sie sowohl Caveolae- und Dynamin-unabhängig ist. Durch die Aktivierung von Rezeptortyrosin-Kinasen werden Membranausstülpungen gebildet, die das umliegende extrazelluläre Medium und die darin enthaltenen Nanopartikel einschließen können.^[95] Diese Membranausstülpungen können mit der Zellmembran fusionieren und sogenannte Macropinosome formen, die zwischen 0,5 μm und 10 μm groß sind.^[96, 97] Anschließend fusionieren Macropinosome schließlich mit Endosomen, die weiter zu Lysosomen dirigiert werden können.

Der intrazelluläre Verbleib der über Endozytose aufgenommenen Nanopartikel ist also nicht zwingend vom Endozytosemechanismus abhängig, da die meisten Endozytosemechanismen (ausgenommen der Cavaeolae-vermittelten Endozytose) in Endosomen enden, die über weitere Fusionen oder Fissionen mit anderen Zellkompartimenten wechselwirken können und den Inhalt z.B. über Exozytose aus der Zelle schleusen oder im Weiteren mit Lysosomen fusionieren. Für den Wirkstofftransport mit Nanopartikeln sind der intrazelluläre Verbleib der Nanopartikel und die Freisetzung aus den Endosomen bzw. Lysosomen jedoch von entscheidender Bedeutung. Im folgenden Abschnitt sollen daher die klassischen Strategien erläutert werden, wie nanopartikuläre Wirkstoffträger den endosomalen und lysosomalen Kompartimenten entkommen und Wirkstoffe kontrolliert in das Zytosol der Zelle transportieren können.

2.5.1.1 Protonenschwammeffekt

Die Verwendung von polykationischen Polymeren wie Polyethylenimin (PEI) für das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen und die damit verbundene Freisetzung aus den Endo- bzw. Lysosomen mit hohen Transfektionseffizienzen ist seit einigen Jahren Gegenstand der Forschung.^[98] Diese Polyamine besitzen eine hohe positive Ladungsdichte, so dass Nukleinsäuren effizient gebunden werden und stabile Polyplexe mit einer positiven Oberflächenladung gebildet werden können.^[99] Gelangen diese Polyplexe über Endozytosemechanismen in Endosomen oder Lysosomen, so können die Aminogruppen des Polymers Protonen aufnehmen, die über die v-ATPase (eine vakuolenmembranständige Adenosintriphosphatase) in der endo-lysosomalen Membran zur Aufrechterhaltung des sauren Milieus in das Lumen gepumpt werden. Neben einem Proton pumpt die v-ATPase auch noch ein Chlorid-Ion und ein Wassermolekül in das Endo-Lysosom. Die Pufferung der Protonen durch die Aminogruppen des Polymers veranlasst die v-ATPase aktiv zu sein, so dass der osmotische Druck in den Endo-Lysosomen stetig steigt. Dies führt zu einem Anschwellen der Endo-Lysosomen und schließlich zur Schädigung der lysosomalen Membran, so dass der Inhalt in das Zytosol der Zelle freigesetzt werden kann (siehe Abbildung 7).^[82, 83, 98, 99]

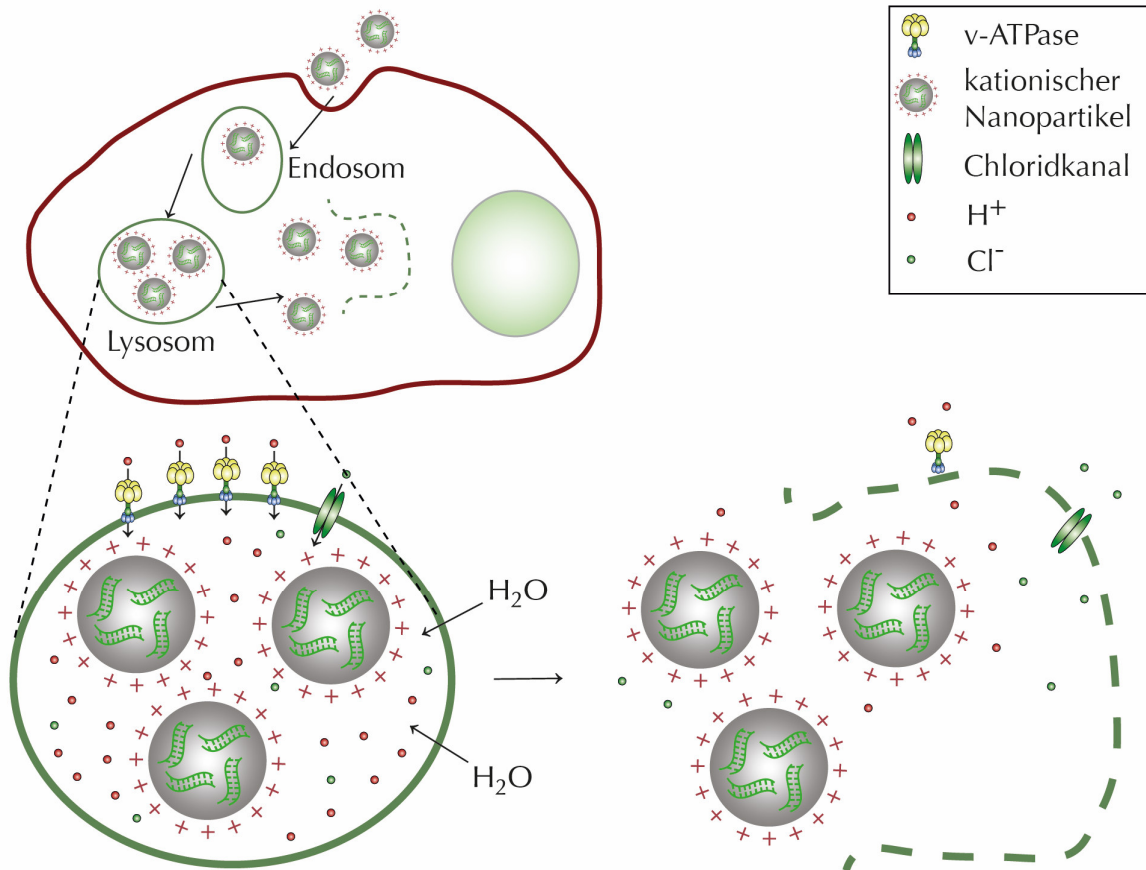


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Protonenschwammeffekts, ausgelöst durch die endozytische Aufnahme von polykationischen Polymeren. Abbildung nach Referenz^[82].

Die Funktionalisierung von Nanopartikeln mit polykationischen Polymeren, die dazu in der Lage sind, den Protonenschwammeffekt auszulösen, steigert neben der Zellaufnahme folglich auch die Freisetzung der Nanopartikel aus den Endosomen und Lysosomen und ist daher ein gängiges Mittel, um die Effizienz eines nanopartikulären Trägersystems für den Wirkstofftransport in das Zytosol einer Zelle zu erhöhen.^[57, 64, 66, 68]

2.5.2 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man in der Gentherapie das Einbringen von Nukleinsäuren (DNA und RNA) fremden Ursprungs in eukaryotische Zellen. Durch das Einbringen von funktioneller, Zielprotein-kodierender DNA kann die Expression eines Zielproteins erhöht werden.^[100] Umgekehrt kann durch das Einbringen von siRNA, die gegen ein bestimmtes Zielprotein gerichtet ist, die

Expression des Zielproteins über den Mechanismus der RNA-Interferenz (siehe Abschnitt 2.5.2.3) inhibiert werden.^[101] Bei hinreichender Transfektionseffizienz eröffnen sich somit therapeutische Möglichkeiten, in die Genexpression einzugreifen, und Krankheiten, die auf einer Überexpression oder Suppression eines Zielproteins basieren, zu behandeln.^[102-105]

Da freie Nukleinsäuren nicht dazu in der Lage sind, die Lipiddoppelschicht der Zellmembran zu überqueren, werden geeignete Trägersysteme benötigt, um die Nukleinsäuren in das Zellinnere zu transportieren.^[106]

Konzeptionell wird zwischen viralen^[107] und nicht-viralen Trägermaterialien unterschieden.^[62] Viren haben eine Reihe effizienter Mechanismen entwickelt, um ihr Genom in das Zytosol einer Zielzelle zu transportieren.^[106] Virale Trägermaterialien, z.B. auf der Basis von Adeno-^[108, 109] und Retroviren,^[110] nutzen diese effizienten Mechanismen der Zelltransfektion und zeichnen sich in der Regel durch hohe Transfektionseffizienzen aus.^[107] Wegen des Risikos einer Immunreaktion, toxischer Effekte und einer Rekombination der viralen Trägermaterialien, werden derzeit nicht-virale Transfektionsmethoden als nebenwirkungsärmere Alternative zu viralen Transfektionsmethoden untersucht.^[111-113]

Bei nicht-viralen Transfektionsmethoden wird noch weiter zwischen physikalischen und chemischen Transfektionsmethoden unterschieden. Zu den physikalischen Methoden gehören unter anderem die Elektroporation,^[114, 115] die Mikroinjektionstechnik^[116] und die sog. *gene gun*.^[117, 118] Chemische Transfektionsmethoden basieren in der Regel auf (anorganischen) Nanopartikeln,^[62] Liposomen,^[119, 120] oder Polymeren,^[121] die Nukleinsäuren komplexieren können. Diese nanopartikulären Trägermaterialien werden zumeist endozytotisch aufgenommen (siehe Abschnitt 2.5.1) und transportieren so Nukleinsäuren in das Zytosol der Zelle.

Polymer-basierte und liposomale Trägersysteme sind zumeist polykationische Substanzen, die Nukleinsäuren über elektrostatische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren komplexieren. Das sehr häufig als Transfektionsmittel verwendete polykationische Polymer Polyethylenimin (PEI) bildet z.B. sogenannte Polyplexe mit Nukleinsäuren aus, die eine positive Oberflächenladung besitzen. Diese Polyplexe zeigen zudem eine hohe Affinität zu der negativ geladenen Zellmembran und werden folglich effizient von

Zellen endozytotisch aufgenommen. Des Weiteren sind die meisten polykationischen Polymere in der Lage, den Endo-Lysosomen durch Induktion des Protonenschwammeffekts und durch Membranfusion zu entkommen (siehe Abschnitt 2.5.1).^[82, 98, 121]

Dieses Prinzip lässt sich auch auf liposomale Transfektionsmittel wie die kommerziell erhältlichen Transfektionsmittel Lipofectamine® und Polyfect® und kationische Lipide wie 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (DOTAP) übertragen. Ein Nachteil dieser polykationischen Transfektionsmittel ist jedoch die hohe Zytotoxizität gegenüber den transfizierten Zellen.^[99, 111, 122] Um dieses Problem zu umgehen, wurden anorganische Nanopartikel aus den unterschiedlichsten Trägermaterialien für Nukleinsäuren entwickelt.

Neben metallischen Nanopartikeln z.B. aus Gold,^[112, 123] Silber,^[112, 124] Palladium^[125] und Platin^[126] werden insbesondere Eisenoxide^[127, 128] aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften und Siliciumdioxid-Nanopartikel^[129, 130] wegen der Möglichkeit, die Oberfläche vielfältig zu modifizieren, als Trägermaterialien eingesetzt.^[62]

Da in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf Calciumphosphat-Nanopartikeln als Wirkstoffträgersystem liegt, werden im folgenden Abschnitt Calciumphosphat-Nanopartikel als Trägermaterial für den Transport von Nukleinsäuren in Zellen gesondert diskutiert.

2.5.2.1 Calciumphosphat-Nanopartikel als Wirkstoffträger für Nukleinsäuren

Calciumphosphat-Nanopartikel sind als keramisches Trägermaterial und Bestandteil des menschlichen Hartgewebes besonders biokompatibel.^[27, 53, 65]

Der Einsatz als Trägersystem für Nukleinsäuren wurde zuerst von Graham und van der Eb 1973 beschrieben und ist heute als „Standard-Calciumphosphat-Methode“ bekannt.^[70] Bei der Standard-Calciumphosphat-Methode wird eine Calciumchlorid-Lösung mit Nukleinsäuren vermischt und schließlich in eine Phosphat-gepufferte Salzlösung gegeben, so dass Calciumphosphat-Nano- und Mikropartikel ausfallen. Nachteile dieser Methode sind die schlechte Reproduzierbarkeit, die breite Größenverteilung der Nanopartikel und der geringe Schutz der an der Oberfläche adsorbierten Nukleinsäuren vor degradierenden Enzymen. In den letzten Jahrzehnten wurde die Standard-Calciumphosphat-

Methode daher von einigen Gruppen weiterentwickelt und optimiert. Sokolova *et al.* entwickelten beispielsweise eine kontrollierte Fällungsreaktion, bei der zunächst in einem Rohrreaktor eine Lösung aus Calciumnitrat und Diammoniumhydrogenphosphat mit einer Peristaltikpumpe zusammengeführt wurden, so dass Calciumphosphat nanopartikulär ausfiel. Um weiteres Kristallwachstum zu inhibieren und die Oberfläche der Nanopartikel zu funktionalisieren, wurden die ausgefällten Calciumphosphat-Nanopartikel in eine Nukleinsäure-Lösung gegeben. Dabei adsorbierten die Nukleinsäuren über das Phosphatrückgrat an die Oberfläche der Calciumphosphat-Nanopartikel (siehe Abbildung 8) und stabilisierten diese elektrosterisch.^[62, 65, 66, 80]

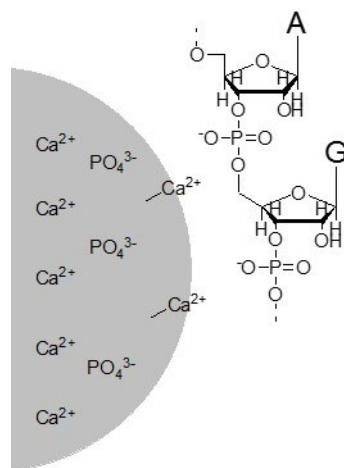


Abbildung 8: Schematische Darstellung der elektrosterischen Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln durch Nukleinsäuren.

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass eine zusätzliche Schicht Calciumphosphat die Nukleinsäure vor dem enzymatischen Verdau durch Nukleasen schützt und dadurch höhere Transfektionseffizienzen erzielt werden können. Klesing *et al.* entwickelten einen semi-kontinuierlichen Syntheseprozess für die Herstellung von kationischen, PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln, die in weiteren Schritten mittels *Layer-by-Layer*-Verfahren mit Nukleinsäuren umgeladen werden konnten. Eine erneute Umladung mit einer zusätzlichen PEI-Schicht wirkte sich auch hier positiv auf die Transfektionseffizienzen aus.^[68, 131, 132] Einen vergleichbaren Ansatz wählten Xie *et al.*, indem sie Calciumphosphat-Nanopartikel mit Polyethylenglykol-modifiziertem Chitosan (PEG-Chitosan) stabilisierten und diese kationischen Calciumphosphat-PEG-Chitosan-

Nanopartikel mit siRNA dotierten.^[133] Kozlova *et al.* entwickelten mehrschalige Calciumphosphat-Nanopartikel, stabilisiert mit PEI und funktionalisiert mit einer äußeren Silica-Schale. Diese Calciumphosphat-PEI-Silica-Nanopartikel konnten in weiteren Schritten leicht mit Antikörpern für ein spezifisches Ansteuern von Zellen funktionalisiert werden.^[69] Auch andere Forschungsgruppen machten sich die Synthese nach diesem Baukastenprinzip zu Nutze. Roy *et al.* entwickelten beispielsweise ein Trägersystem, basierend auf einem Calciumphosphat-DNA-Kern, und einer Schale, bestehend aus PMMA. Die Carboxylgruppen der PMMA-Schale wurden in weiteren Schritten mit Peptiden und Antikörpern für ein spezifisches Ansteuern von Zellen funktionalisiert.^[58]

2.5.2.2 Transfektion mit Plasmid-DNA

Die Transfektion mit Plasmid-DNA lässt sich mechanistisch in mehrere Teilschritte gliedern (siehe Abbildung 9). Zunächst müssen die mit Nukleinsäure beladenen Nanopartikel endozytotisch aufgenommen werden (siehe Abschnitt 2.5.1). Dabei bilden sich endosomale Kompartimente aus, welche die Nanopartikel in das Zellinnere transportieren. Die Endosomen können anschließend über weitere Fusionen oder Fissionen mit Zellkompartimenten wechselwirken und z.B. mit Lysosomen fusionieren, in denen die DNA durch Nukleasen schnell degradiert wird. Des Weiteren können die Nanopartikel auch über Exozytose-mechanismen aus der Zelle geschleust werden. Für eine erfolgreiche Transfektion sollten die DNA-beladenen Nanopartikel folglich möglichst schnell aus den Endosomen bzw. Lysosomen in das Zytosol der Zelle freigesetzt werden.

Im Zytosol der Zelle wird freie DNA jedoch schnell durch zytosolische Nukleasen abgebaut. Das nanopartikuläre Trägersystem sollte die DNA für eine erfolgreiche Transfektion vor diesem Abbauprozess schützen und die DNA schließlich in den Zellkern transportieren. Dort erfolgen die Transkription durch die RNA-Polymerase in die prä-*mRNA*, die Prozessierung zur *mRNA* und schließlich der Austritt in das Zytosol, wo an den Ribosomen die Translation in das entsprechend kodierte Protein erfolgt.^[43]

Der Mechanismus des Transports der freigesetzten zytosolischen DNA in den Zellkern ist jedoch bisher noch unklar.^[6] Als wahrscheinlichste Möglichkeiten werden hier in der Literatur der Transport durch Kernporen^[134] und die

Assoziation mit Chromatin während der Mitose^[135-138] beschrieben. Der Transport durch Kernporen scheint jedoch nur möglich, wenn die zu transportierende DNA spezifische Sequenzen enthält, die von Transkriptionsfaktoren (speziell von NFκB, engl.: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) der Zelle erkannt werden^[134] und das Trägersystem zusätzlich NFκB aktiviert.^[84, 139-141]

Der zweite Mechanismus, mit Kernmaterial (insbesondere Chromatin) während der Mitose (sobald die Zellkernmembran aufgelöst ist) zu wechselwirken, ist der wahrscheinlichste Mechanismus und wurde in zahlreichen Studien beschrieben.^[6, 135-138, 142] Der Schutz vor lysosomalen Nukleasen durch das Trägersystem ist bei diesem Aufnahmemechanismus besonders wichtig, da die DNA bis zur nächsten Zellteilung intakt im Zytosol der Zelle verbleiben muss.^[6, 143] Tachibana *et al.* und James *et al.* zeigten in ihren Studien, dass ca. 2000-4000 Plasmide pro Zellkern benötigt werden, damit das in der Plasmid-DNA kodierte Gen ausreichend exprimiert wird.^[144, 145] Für Transfektionseffizienzen, die Therapieansätze auf der Basis von Plasmid-DNA ermöglichen, werden folglich sehr effektive Trägermaterialien benötigt.

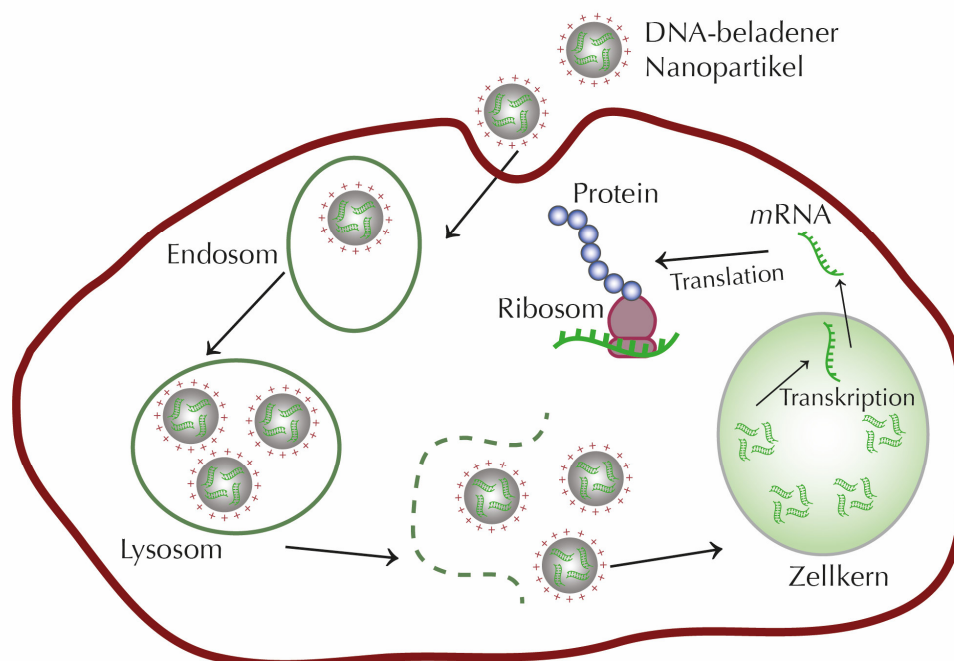


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Transfektion von Zellen mit DNA-funktionalisierten Nanopartikeln.

2.5.2.3 Transfektion mit siRNA und der Mechanismus der RNA-Interferenz

Die Transfektion mit *small interfering RNA* (siRNA) verläuft mechanistisch zunächst analog zur Transfektion mit Plasmid-DNA. Nanopartikel, die mit siRNA beladen wurden, werden von den Zellen endozytotisch aufgenommen und schließlich in Endosomen im Zellinneren transportiert. Auch hier müssen die siRNA-beladenen Nanopartikel möglichst schnell aus den Endosomen freigesetzt werden, um vor den o.g. degradierenden Bedingungen geschützt zu werden.

Anders als bei der Transfektion mit Plasmid-DNA ist die siRNA jedoch schon im Zytosol der Zelle wirksam und muss nicht noch zusätzlich in den Zellkern transportiert werden. Hier kann die siRNA über den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) mit der mRNA des Zielgens wechselwirken und die Translation unterdrücken. In ihrer Schlüsselpublikation^[146] konnten Fire und Mello zeigen, dass durch das Einbringen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Fadenwurm *C. elegans* die Expression des homologen Gens geblockt wurde. In folgenden Studien wurde der Mechanismus der RNAi auch in anderen eukaryotischen Zellen,^[147] insbesondere den Säugetierzellen^[148] aufgeklärt.

Er lässt sich in mehrere Einzelschritte gliedern (siehe Abbildung 10). Im ersten Schritt prozessiert die Endoribonuklease *Dicer* die lange dsRNA (endogenen oder exogenen Ursprungs) über Spaltung der inneren Phosphodiesterbindungen in kürzere, doppelsträngige RNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 21 Nukleotiden (die sog. *small interfering RNA*, siRNA), wobei 19 Nukleotide gepaart und zwei Nukleotide jeweils am 3'-Ende ungepaart als Überhang vorliegen.^[149-151] In Säugetierzellen darf die Länge der dsRNA 30 Nukleotide nicht überschreiten, da sonst eine unspezifische Interferon-Antwort ausgelöst wird und die dsRNA als Pathogen erkannt wird.^[105, 152, 153]

Tuschl *et al.* konnten zeigen, dass synthetisch hergestellte siRNA mit einer Länge von ca. 21 Nukleotiden, die in das Zytosol einer Zelle appliziert wurde, den *Dicer*-Mechanismus umgehen kann.^[147] Befindet sich siRNA (als Produkt von *Dicer* oder synthetisch hergestellt) im Zytosol, so kann diese durch *Dicer* und durch das TAR-RNA-Bindeprotein (TRBP) den sogenannten RISC-loading Komplex (engl.: *RNA-induced silencing complex*, RISC) bilden.^[154] Dadurch wird der RISC-Komplex aktiviert und die siRNA schließlich durch das Argonautenprotein 2 (Ago 2) entwunden und der Passagier-Strang (*Sense*-Strang) geschnitten.^[105, 150, 151, 155, 156] Der RISC-Komplex, beladen mit dem *Antisense*-

Strang der siRNA, wird nun zu der komplementären Ziel-RNA dirigiert, so dass der *Antisense*-Strang der siRNA an die komplementäre Sequenz der Ziel-RNA bindet. Im nächsten Schritt wird die Ziel-RNA im Zentrum des Doppelstranges, zehn Nukleotide entfernt vom 5'-Ende des siRNA-Stranges, durch eine Domäne in Ago2 geschnitten, die dem aktiven Zentrum der unspezifischen Endoribonuklease H (RNase H) ähnelt.^[147, 157] Dadurch verliert die Ziel-RNA die Cap-Struktur an ihrem 5'-Ende sowie den Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und wird schließlich von RNasen abgebaut, so dass das auf der Ziel-RNA kodierte Gen nicht exprimiert werden kann und folglich stummgeschaltet wird.^[105, 151, 158, 159]

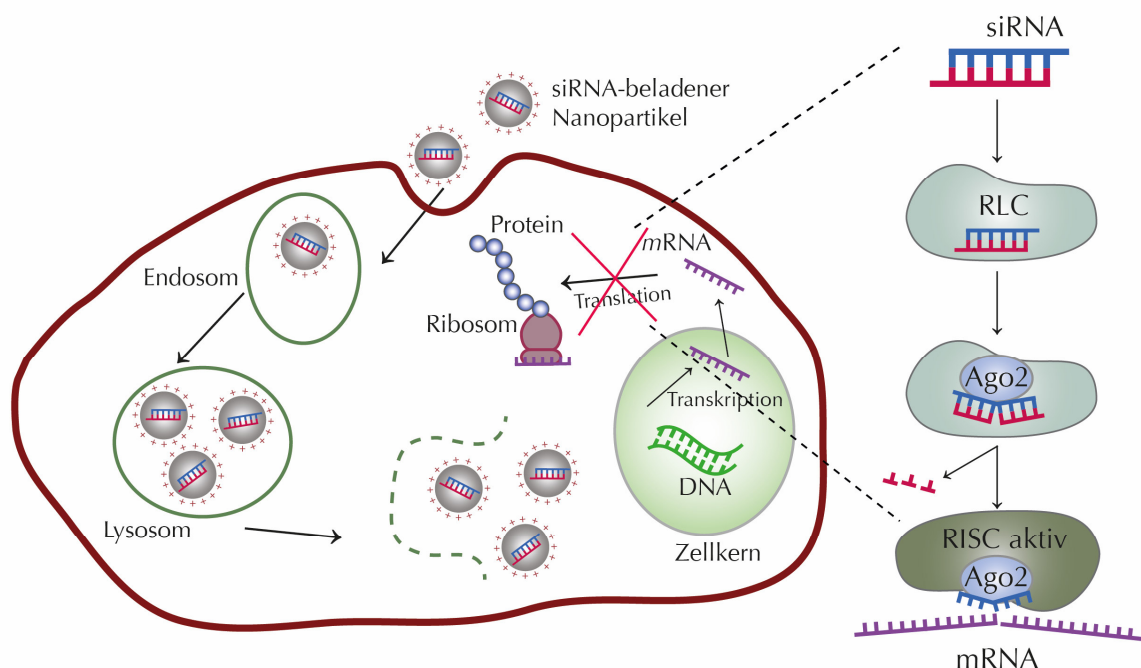


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Genstummschaltung über den Mechanismus der RNA-Interferenz, induziert durch synthetisch hergestellte siRNA.

2.5.3 Knochenaufbau und Knochengeweberemodellierung

Der Großteil des menschlichen Hartgewebes besteht aus Knochen. Humane Knochen sind ein lebendiges Organ mit sowohl stützgebender (mechanischer) als auch physiologischer Funktion für die Bereitstellung von Calcium- und Phosphat-Ionen.^[27, 160] Aus materialwissenschaftlicher Sicht betrachtet ist der Knochen ein Kompositmaterial. Er besteht aus ca. 70 Gew.-% Calciumphosphat (nicht-stöchiometrischer Hydroxylapatit, meist in Form von Carbonatapatit) und aus ca. 30 Gew.-% einer organischen Matrix, die aus ca. 85 - 90 % Typ-1 Kollagen und etwa 200 weiteren Proteinen (z.B. Osteocalcin, Osteonectin und Osteopontin), denen wichtige Signalfunktionen bei der Knochengeweberemodellierung zukommt, besteht.^[27, 161] Dabei sorgt das Kollagen für die Elastizität (Zug- und Biegebelastung) und das Calciumphosphat für die Härte (Druckbelastung).^[27, 162] Die hierarchische Struktur des Knochens lässt sich nach Weiner und Wagner in verschiedene Hierarchieebenen einteilen, angefangen bei den Bestandteilen der mineralisierten Kollagenfaser (Hydroxylapatit-Nanopartikel und Typ-1-Kollagen) bis hin zur komplexen Gesamtstruktur des Knochens (siehe Abbildung 11).^[12, 163, 164]

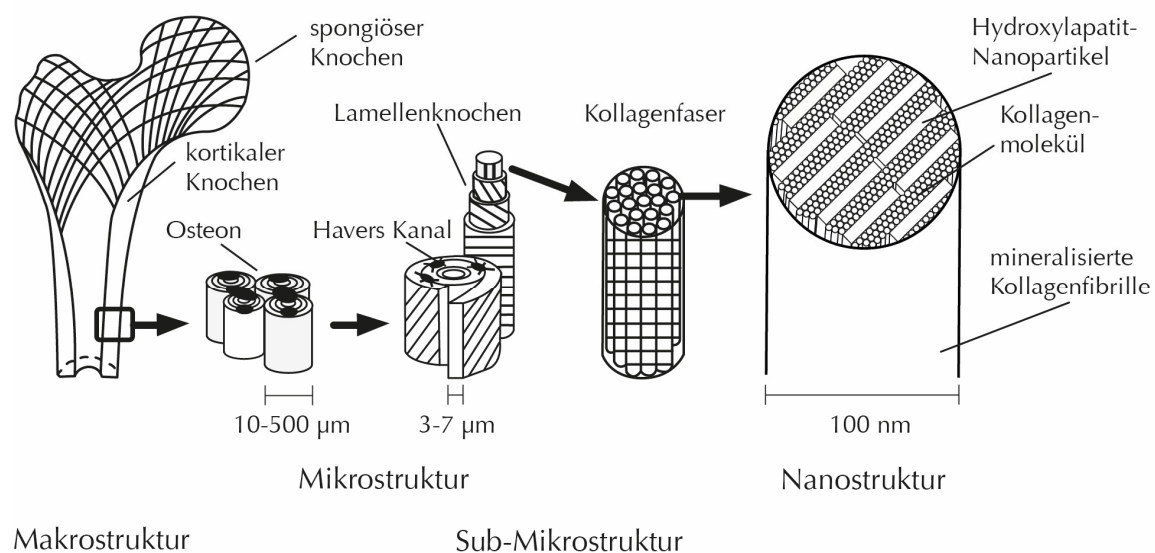


Abbildung 11: Hierarchische Struktur des Knochens nach Weiner und Wagner.
Abbildung nach Referenz.^[164]

Histologisch wird der Knochen in die kompakte äußere Schicht (*Corticalis*, kompakter oder kortikaler Knochen) und den schwammartig aufgebauten Innenraum, die *Spongiosa*, unterteilt. Dabei ist die Porosität des Knochens besonders für den Stoffaustausch und die Zugänglichkeit für Zellen wichtig.^[27] Im Knochen kommen im Wesentlichen Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten (in der Knochenmatrix eingebaute, unbewegliche Zellen) vor.^[27, 165]

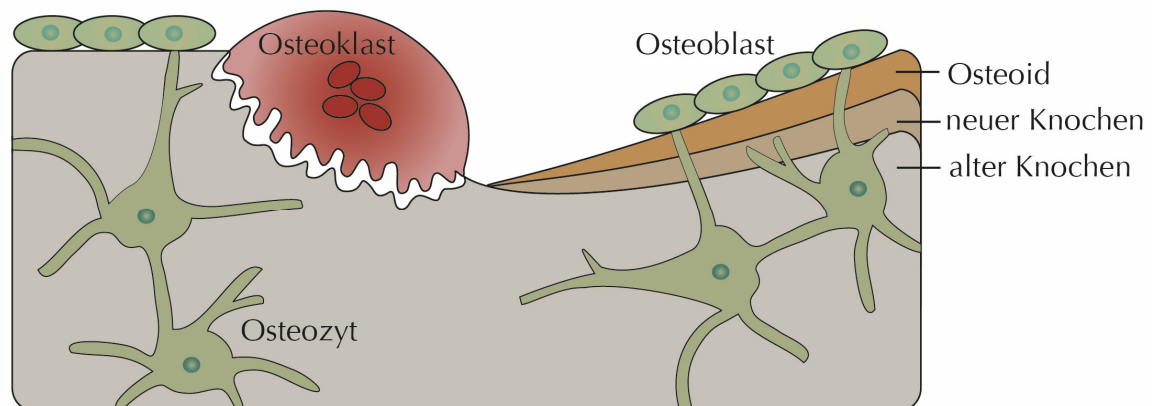


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Knochengerüstremodellierung und die Kommunikation zwischen Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten. Abbildung nach Referenz^[161].

Osteoblasten sind für die Knochenbildung verantwortlich. Dabei synthetisieren sie zunächst die unmineralisierte Knochenmatrix (das sog. Osteoid), welche aus Typ-1-Kollagen besteht. Im nächsten Schritt erfolgt die Mineralisierung mit Calciumphosphat, so dass sich die Osteoblasten in die Knochenmatrix einbetten und zu Osteozyten differenzieren. Die Osteozyten sind mit benachbarten Zellen über *Tight-Junctions* verbunden und in der Lage, mit diesen über verschiedene Signalwege zu kommunizieren (siehe Abbildung 12).^[161] Es wird vermutet, dass den Osteozyten wegen der Fähigkeit mit Osteoblasten und Osteoklasten zu kommunizieren, eine entscheidende Bedeutung bei der Knochengerüstremodellierung zukommt.^[27, 161] Osteoklasten sind für die Knochenresorption verantwortlich. Durch Ansäuerung der Umgebung (Ausschüttung von Protonen) können diese Zellen die mineralische Matrix auflösen und zudem durch die Freisetzung von Enzymen (TRAP, engl.: *tartrate-resistant acid phosphatase* und CATK, Cathepsin K) die (Kollagen-)Matrixproteine spalten.^[165] Knochengerüst

ist also kein statisches, sondern ein lebendiges Organ, das stetig auf- und abgebaut wird. Diesen Prozess nennt man Knochenremodellierung. Er stellt einen wichtigen Anknüpfungspunkt für die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien dar. Knochenersatzmaterialien sollten möglichst gut in diesen Prozess integriert werden und sowohl von Osteoklasten resorbierbar sein als auch die Knochenbildung durch Osteoblasten ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird verwendet, um Präparatoberflächen abzubilden. Dafür wird ein Elektronenstrahl mittels einer Glühkathode erzeugt, in Richtung der Anode beschleunigt und durch ein Linsensystem auf einen Punkt der Präparatoberfläche fokussiert. Dieser fein fokussierte Elektronenstrahl rastert die Probenoberfläche zeilenförmig ab und erzeugt an der Stelle, an der er sich befindet, hochenergetische Rückstreuелеktronen und niederenergetische Sekundärelektronen, die schließlich mit Hilfe eines Detektors registriert und in elektrische Signale umgewandelt werden. Dadurch entsteht ein Hell-Dunkel-Bild der Präparatoberfläche. Sofern die Probe leitfähig ist, bedarf es keiner besonderen Probenpräparation. Nichtleitende Präparate müssen jedoch zur Vermeidung von Aufladungen zuvor mit einer dünnen leitenden Schicht versehen werden. Dafür können beispielsweise Metalle (in der Regel Gold oder Palladium) auf das Präparat aufgedampft werden. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem ESEM Quanta 400 FEG (FEI) angefertigt. Nanopartikel wurden, sofern nicht anders beschrieben, als wässrige Dispersion auf mit Isopropanol gereinigte Silicium-Wafer aufgetragen und an Luft getrocknet. Mikrokompositpartikel wurden, sofern nicht anders beschrieben, als getrockneter Feststoff auf ein selbstklebendes Kohle-Pad gegeben. Alle nichtleitenden Proben wurden mit einer dünnen Schicht (<2 nm) einer Gold-Palladium-Legierung im Verhältnis Gold zu Palladium = 20:80 bedampft.

3.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl.: *energy dispersive X-Ray spectroscopy*, EDX) eignet sich für die qualitative und semi-quantitative Analyse der elementaren Zusammensetzung von Festkörpern. Durch die Bestrahlung mit einem Elektronenstrahl können Elektronen in einem Atom eines Festkörpers herausgeschlagen werden. Der dadurch entstehende unbesetzte Energiezustand wird schließlich mit einem energiereicheren Elektron aus einer höheren Schale desselben Atoms besetzt. Die bei diesem Prozess freiwerdende, spezifische

Energie, die der Energiedifferenz des Übergangs entspricht, wird als Röntgenquant emittiert und ist elementspezifisch. Für ein Element sind mehrere Übergänge erlaubt, so dass ein Spektrum mit mehreren Signalen für die charakteristischen Übergänge eines Elements entsteht. In dieser Arbeit wurden alle EDX-Aufnahmen mit einem Genesis 4000 (EDAX), gekoppelt an ein ESEM Quanta 400 FEG (FEI), angefertigt. Nanopartikel wurden, sofern nicht anders beschrieben, als wässrige Dispersion auf mit Isopropanol gereinigte Silicium-Wafer aufgetragen und an Luft getrocknet. Mikrokompositpartikel wurden, sofern nicht anders beschrieben, als getrockneter Feststoff auf ein selbstklebendes Kohle-Pad gegeben. Alle nichtleitenden Proben wurden mit einer dünnen Schicht (<2 nm) einer Gold-Palladium-Legierung im Verhältnis Gold zu Palladium = 20:80 bedampft.

3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (engl.: *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) ist eine fluoreszenzmikroskopische Technik, die zumeist in der Biologie genutzt wird, um Aufnahmen von Zellen anzufertigen. Bei der CLSM werden die Proben schrittweise mit einem Laser definierter Wellenlänge abgerastert und nur solche Strukturen abgebildet, die mit Fluorophoren markiert sind. Im Vergleich zum konventionellen Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop besitzt das CLSM die sogenannte konfokale *Pinhole*-Anordnung und einen Strahlteiler, der Anregungslicht des Lasers reflektiert und die emittierte Fluoreszenzstrahlung durchlässt. Durch die konfokale *Pinhole*-Anordnung wird Strahlung, welche nicht aus der Fokusebene stammt, vor dem Detektor ausgeblendet (siehe Abbildung 13). Durch das Abrastern der Probe ist es mit dieser konfokalen Anordnung möglich, exakte optische Schnitte der Probe zu erhalten, die nicht durch Fluoreszenzlicht anderer Regionen der Probe gestört werden.^[166] In dieser Arbeit wurden alle CLSM-Aufnahmen mit einem Leica SP5 CLSM und einem 63x Wasser-Immersionsobjektiv durchgeführt. Die Wellenlänge des Lasers betrug 488 nm für die Anregung grünfluoreszierender Farbstoffe (Emissionswellenlänge: 500-520 nm) und 561 nm für die Anregung rotfluoreszierender Farbstoffe (Emissionswellenlänge: 580-600 nm).

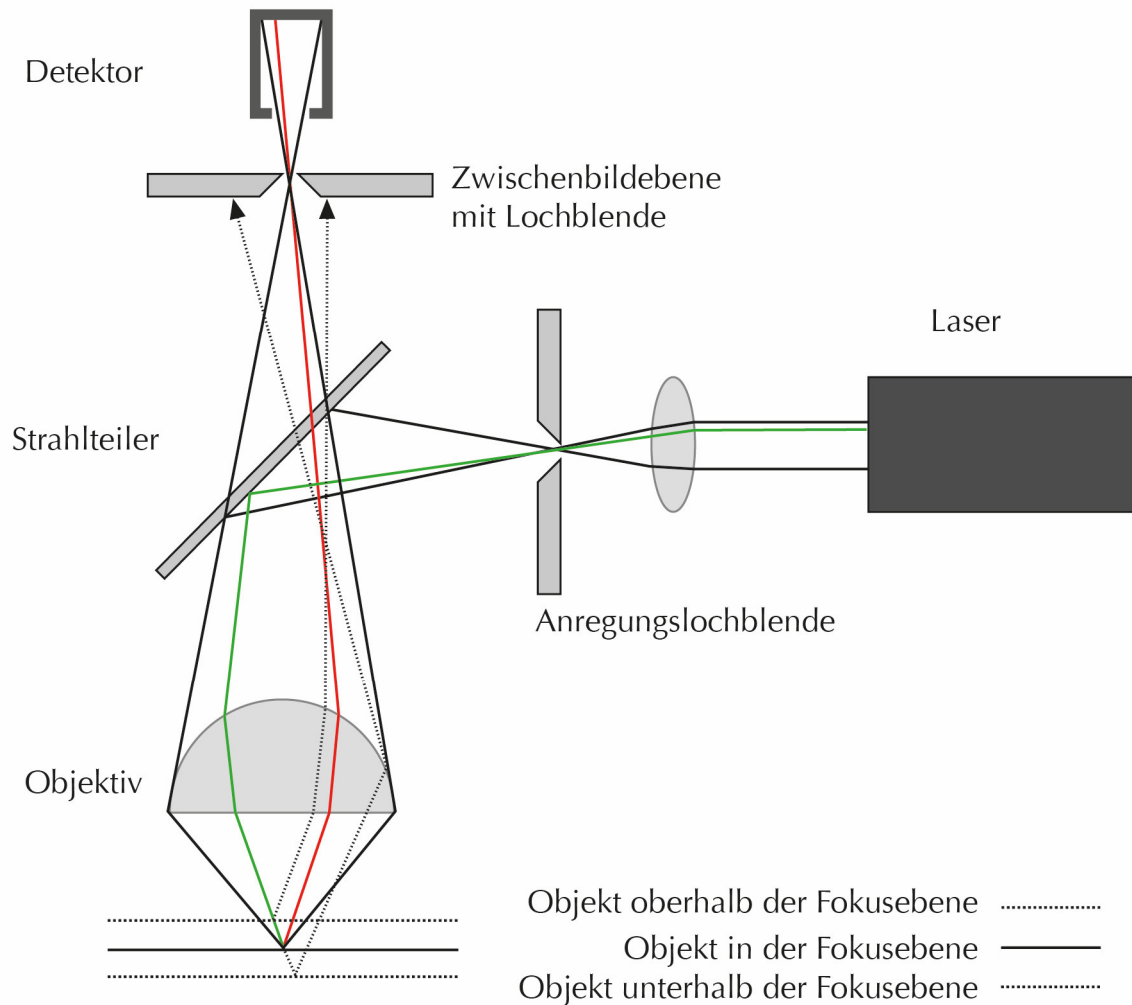


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

3.4 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie ist ein spektroskopisches Verfahren zur Ermittlung der Extinktion einer Substanz im ultravioletten (200 - 400 nm) und im sichtbaren (400 - 800 nm) Wellenlängenbereich. Moleküle können Strahlung in Form von Quanten bestimmter Energie, $h\nu$, absorbieren und dadurch in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt werden. Trifft ein Lichtstrahl mit der Intensität I_0 auf ein homogenes Medium mit der Schichtdicke d , so wird er durch die Absorption des gelösten Stoffes abgeschwächt (Intensität I).

Die Extinktion E_λ bzw. die Absorption (Gleichung 1) wird bei der UV/Vis-Spektroskopie in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts detektiert und steht über das *Lambert-Beersche Gesetz* mit der Stoffmengenkonzentration c , der Schichtdicke d der Küvette und dem molaren Extinktionskoeffizienten ε in folgender Beziehung:^[44, 167]

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

In dieser Arbeit wurden für quantitative Untersuchungen Verdünnungsreihen bekannter Konzentration angefertigt und Kalibriergraden für die jeweiligen Stoffe durch lineare Regression angefertigt. Alle UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Varian Cary Bio 300 Spektrophotometer durchgeführt und die Proben in einer Quatzküvette mit einer Schichtdicke $d=1$ cm vermessen. Mittels Referenzmessungen in reinem Lösemittel wurde zudem der Einfluss der Quatzküvette und des Lösemittels auf die Extinktion der Probe herausgerechnet. Dafür wurde der Hintergrund bei der Probenmessung automatisch subtrahiert. Jede Messung wurde gegenüber einer Referenzmessung im gleichen Lösemittel mit ungestörtem Strahlengang vermessen (Methode des doppelten Strahlengangs).

3.5 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (engl.: *dynamic light scattering*, DLS) ist ein dynamisches Streulichtverfahren, mit dem der hydrodynamische Radius von Kolloiden im Dispersionsmedium bestimmt werden kann. Neben der mittleren Teilchengröße lässt sich auch der Polydispersitätsindex (PDI) bestimmen, welcher ein Maß für die Größenverteilung der Kolloide ist. Bei der Größenbestimmung mittels dynamischer Streulichtverfahren wird die Brown'sche Molekularbewegung der dispergierten Kolloide genutzt. Die zu untersuchende Dispersion wird dafür mit einem monochromatischen Lichtstrahl bestrahlt. Ein Teil des Lichtes wird durch die Kolloide gestreut, während der andere Teil durch die Dispersion hindurch dringt. Das Streulicht wird in einem festen Winkel detektiert. Durch die stetige Bewegung der Teilchen kommt es schließlich zu konstruktiver und destruktiver Interferenz der gestreuten Strahlung, so dass

Fluktuationen in der Intensität des Streulichtes auftreten. Der Detektor registriert diese Fluktuationen, so dass über die Stokes-Einstein-Beziehung (siehe Gleichung 2) und die Kumulantenmethode diese Signale in eine Größenverteilung (hydrodynamischer Radius) umgewandelt werden können:[76]

$$r = \frac{RT}{N_A 6\eta\pi D} \quad (2)$$

r = hydrodynamischer Radius

R = Gaskonstante

T = Temperatur

N_A = Avogadrokonstante

η = Viskositätskoeffizient

D = Diffusionskoeffizient

Als Ergebnis dieser Messungen erhält man die durchschnittliche hydrodynamische Größe, die Standardabweichung und den Polydispersitätsindex (PDI). Kolloidale Systeme mit einem PDI zwischen 0 und 0,3 gelten als monodisperse Systeme.[76] Des Weiteren kann mittels der dynamischen Lichtstreuung das Zeta-Potential der Partikel bestimmt werden. Wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben wurde, ist das Zeta-Potential als Potentialdifferenz zwischen der Scherschicht des Kolloids und der Volumenphase des Dispersionsmediums definiert. Werden nun spezielle Küvetten genutzt, in die Elektroden integriert sind und an denen eine definierte Spannung anliegt, so findet folglich ein Ladungstransport statt. Die geladenen Partikel wandern zur Elektrode mit entgegengesetzter Ladung, wodurch sich wiederum eine Potentialdifferenz ergibt, die jedoch nur indirekt gemessen werden kann. Dafür nutzt man die elektrophoretische Mobilität und die thermische Eigenbewegung der Partikel und misst die Bewegung der geladenen Partikel in einem definierten elektrischen Feld. Dadurch ergeben sich ähnlich der Größenbestimmung wieder Fluktuationen in der Intensität des gestreuten Lichtes, so dass über die Geschwindigkeit der Partikel das Zeta-Potential bestimmt werden kann.[74, 77]

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Bestimmungen des hydrodynamischen Durchmessers und des Zeta-Potentials mit dem Malvern Zetasizer NanoZS ($\lambda = 633 \text{ nm}$) durchgeführt.

3.6 Röntgenpulverdiffraktometrie

Die Röntgendiffraktometrie (engl.: *X-ray diffraction*, XRD) ist ein Verfahren, um die Struktur von Kristallen zu bestimmen. Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung entspricht dabei ungefähr den Atomabständen in Kristallgittern. Wird ein Kristall mit Röntgenstrahlung bestrahlt, so wirkt das Kristallgitter wie ein dreidimensionales Beugungsgitter. Die Röntgenstrahlung wird schließlich an der Elektronenhülle der Atome im Kristallgitter gebeugt, so dass die von den einzelnen Atomen gebeugten Wellen miteinander, abhängig vom Abstand der Atome untereinander, konstruktiv oder destruktiv interferieren können. Konstruktive Interferenz führt zu Beugungsreflexen und tritt unter nur ganz bestimmten Winkeln (sogenannte *Braggsche Winkel*) auf, wenn die Weglängendifferenz zweier paralleler Strahlen ein ganzes Vielfaches der Anregungswellenlänge ist. Andernfalls löschen sich die Anregungswellen durch destruktive Interferenz aus. Dieser Zusammenhang wird in der *Braggschen Gleichung* (Gleichung 3) beschrieben:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (3)$$

n = Beugungsordnung

λ = Anregungswellenlänge

d = Abstand der Netzebenen

θ = Beugungswinkel

Das daraus resultierende Diffraktogramm ist charakteristisch für eine kristalline Substanz. Die in dieser Arbeit gezeigten Röntgenpulverdiffraktogramme wurden mit einem Bruker D8 Advance Pulverdiffraktometer aufgenommen und mit Hilfe von Datenbanken mit den literaturbekannten Reflexen der jeweiligen Substanzen verglichen.

3.7 Thermogravimetrie

Die Thermogravimetrische Analyse (TGA) ist eine gravimetrische Analyse-methode zur Bestimmung der Massenänderung einer Probe in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit. Dafür wird eine definierte Probenmenge in einen temperaturstabilen Aluminiumoxid-Tiegel gegeben und die Massenänderung bei einer definierten Heizrate unter einer definierten Gasatmosphäre gemessen. Die Massenänderung wird schließlich als Funktion der Temperatur aufgetragen. Das resultierende Thermogramm zeigt in der Regel charakteristische Bereiche (Zersetzungsstufen), die Aussagen über das Probenmaterial zulassen. In dieser Arbeit wurden alle gezeigten Thermogramme mit einer konstanten Heizrate von 2 K min^{-1} in einer Sauerstoffatmosphäre mit einem Volumenstrom von 25 mL min^{-1} in einem Temperaturbereich von 30 °C bis 1200 °C mit der TG 449 F3 Jupiter® der Firma Netzsch durchgeführt.

3.8 Elementaranalyse und Atomabsorptionsspektroskopie

Die Elementaranalyse dient der quantitativen Bestimmung des Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Gehaltes (CHNS) einer Probe und ist ein verbrennungsanalytisches Verfahren. Dabei wird die Probe in einem Oxidationsreaktor unter Sauerstoffatmosphäre verbrannt, so dass Kohlenstoff zu Kohlenmonoxid und Kohlendioxid und Schwefel zu Schwefeloxid und Stickstoff zu Stickoxiden oder molekularem Stickstoff reagieren kann. Mittels Gaschromatographie können die daraus entstehenden Gase voneinander getrennt und schließlich mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor quantitativ bestimmt werden. Alle CHNS-Anteile in dieser Arbeit wurden mit einem CHNS-Analysator Euro EA der Firma Euro Vector bestimmt.

Bei der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) wird die Probe zunächst atomisiert und mit monochromatischer Strahlung bestrahlt. Die atomisierte Probe absorbiert das eingestrahlte Licht dabei gemäß des *Lambert-Beerschen-Gesetzes*. Durch einen Vergleich der gemessenen Intensität mit einer Kalibriergeraden kann so auf die Konzentration der unbekannten Probe geschlossen werden. Zur Bestimmung der Calcium-Gehalte der Nanopartikel wurden in dieser Arbeit alle AAS-Untersuchungen mit dem Atomabsorptionsspektrometer der M-Serie von Thermo Electron durchgeführt.

3.9 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung, auch Lyophilisation genannt, ist eine schonende Trocknungsmethode für wässrige Lösungen oder Dispersionen. Sie beruht auf dem Prinzip der Sublimation. Bei der Sublimation von Wasser gehen Wassermoleküle gemäß des Phasendiagramms von Wasser bei Umgebungsdrücken < 6 mbar und Temperaturen < 0 °C direkt aus der festen Phase in die gasförmige Phase über. Die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel wurden in dieser Arbeit direkt nach der Synthese in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Gefrier-trockner Alpha 2-4 LSC der Firma Martin Christ bei 0,31 mbar und -10 °C für 72 h gefriergetrocknet.

4 Experimenteller Teil

4.1 Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel für den Wirkstofftransport

4.1.1 Synthese von Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikeln

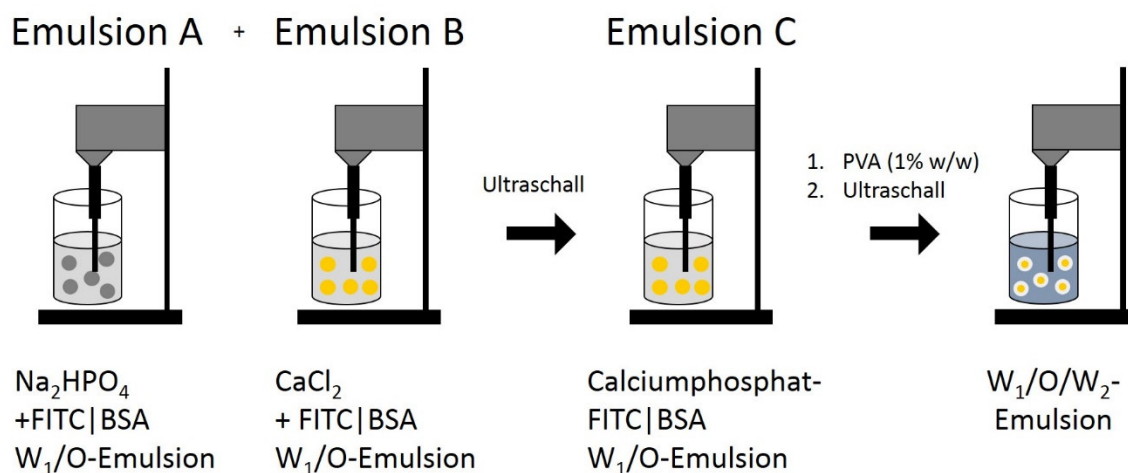


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Synthese von Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikeln mittels einer W₁/O/W₂-Emulsion.

Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel, beladen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Rinderserumalbumin (engl.: *bovine serum albumine*, BSA), wurden über eine modifizierte Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion (W₁/O/W₂-Emulsion) nach Tang *et al.* synthetisiert (siehe Abbildung 14).^[168] Dafür wurden zunächst zwei separierte primäre Wasser-in-Öl-Emulsionen (W₁/O-Emulsion A und B) mittels Ultraschallbehandlung (Hielscher UP50H, Sonotrode MS2, 70 % Amplitude, Puls 0,7) hergestellt. Für Emulsion A wurde FITC-BSA ($M_w = 66\,000\text{ g mol}^{-1}$, $m = 625\text{ }\mu\text{g}$) in einer wässrigen Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($V = 125\text{ }\mu\text{L}$, $c = 10\text{ mM}$) gelöst. Diese wässrige FITC-BSA-Lösung wurde schließlich in einer Lösung von PLGA in Dichlormethan ($V = 375\text{ }\mu\text{L}$, $c = 13,3\text{ mg mL}^{-1}$) mittels Ultraschallbehandlung für 20 s emulgiert. Dabei bildete sich eine milchig gelbe W₁/O-Emulsion aus. Für Emulsion B wurde FITC-BSA ($m = 625\text{ }\mu\text{g}$) in einer wässrigen Calciumchlorid-Lösung ($V = 125\text{ }\mu\text{L}$, $c = 1,25\text{ M}$) gelöst. Diese wässrige FITC-BSA-Lösung wurde schließlich in einer

Lösung von PLGA in Dichlormethan ($V = 375 \mu\text{L}$, $c = 13,3 \text{ mg mL}^{-1}$) mittels Ultraschallbehandlung für 20 s emulgiert. Dabei bildete sich eine milchig gelbe W_1/O -Emulsion aus. Anschließend wurden beide Emulsionen (A und B) unter Ultraschallbehandlung für 20 s vereinigt (Emulsion C). Diese W_1/O -Emulsion wurde anschließend tropfenweise in die kontinuierliche wässrige Phase ($V = 3 \text{ mL}$), die zusätzlich mit Polyvinylalkohol ($M_w = 30\,000 - 70\,000 \text{ g mol}^{-1}$, 87-90 % hydrolisiert, $m = 30 \text{ mg}$) stabilisiert wurde, gegeben. Nach erneuter Ultraschallbehandlung für 20 s bildete sich eine milchig-gelbe Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion ($W_1/O/W_2$ -Emulsion) aus. Damit das Dichlormethan verdampfte, wurde diese Emulsion bei Raumtemperatur für 3 h gerührt (800 U min^{-1}). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die Nanopartikeldispersion gelb und nahezu transparent. Der Überschuss an Polyvinylalkohol und nicht eingeschlossenem FITC-BSA wurde anschließend mittels Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, $t = 30 \text{ min}$ bei $14\,800 \text{ U min}^{-1}$) und Redispergieren in Reinstwasser (insgesamt drei Mal) entfernt. Um die Verkapselungseffizienz zu bestimmen, wurde zunächst der Überstand mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 460 nm (Absorptionsmaximum von FITC-BSA) anhand einer zuvor erstellten Kalibriergeraden, bei der die Absorption bei 460 nm (y) gegen die FITC-BSA-Konzentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$ (x) aufgetragen wurde ($y = 0,00449x$, $R^2 = 0,99805$), analysiert. Die Verkapselungseffizienz wurde dann über Gleichung (4) berechnet:

$$VE(\%) = \frac{\text{Wirkstoff(eingesetzt)} - \text{Wirkstoff(Überstand)}}{\text{Wirkstoff(eingesetzt)}} \times 100 \% \quad (4)$$

Gleichung 4: VE : Verkapselungseffizienz des eingesetzten Wirkstoffes in Prozent. *Wirkstoff(eingesetzt)*: Die in der Synthese verwendete Menge an Wirkstoff. *Wirkstoff(Überstand)*: Die mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmte Menge an Wirkstoff im Überstand.

Die aufgereinigten und redispergierten Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich für 72 h bei 0,31 mbar und -10°C lyophilisiert.

4.1.2 Synthese von Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikeln

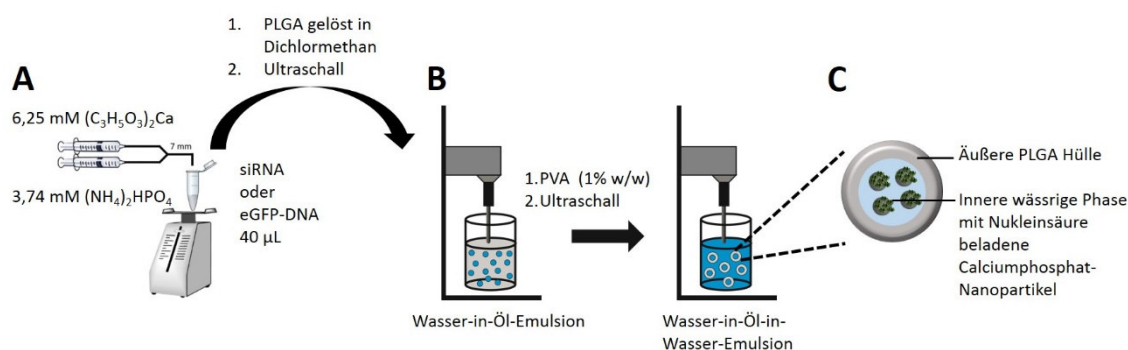


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Synthese von Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln (A) und die Verkapselung in eine PLGA-Matrix mittels der $W_1/O/W_2$ -Emulsionstechnik (B). Modellhafte Struktur der PLGA-Nanopartikel, die die Nukleinsäure beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel tragen.

Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikel wurden über einen zweistufigen Syntheseprozess synthetisiert. Im ersten Syntheseschritt wurden zunächst Calciumphosphat-Nanopartikel in einer kontrollierten Fällungsreaktion nach einer modifizierten Synthese von Sokolova *et al.* hergestellt (siehe Abbildung 15).^[57, 65, 66, 80] Dafür wurden in einem Rohrreaktor Lösungen von Calciumnitrat ($c = 6,25$ mM, $V = 105$ μ L) und Dinatriumhydrogenphosphat ($V = 105$ μ L, $c = 3,74$ mM) mit einer Spritzenpumpe zusammengeführt und in eine anti-eGFP-siRNA-Lösung ($V = 40$ μ L, $c = 2,5$ mg mL⁻¹) getropft. Die Fließgeschwindigkeit der Calciumnitrat- und der Dinatriumhydrogenphosphat-Lösungen betrug jeweils 16,6 μ L s⁻¹, und die Verweilzeit im Rohrreaktor (Nukleationszeit) betrug 1,3 s. Die resultierende Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikeldispersion wurde anschließend für 5 min bei 4 °C im Eisbad gekühlt, bevor diese im nächsten Syntheseschritt für die Verkapselung in eine PLGA-Matrix verwendet wurde.

Für die Verkapselung der Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikel in eine PLGA-Matrix wurde eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechnik ($W_1/O/W_2$ -Emulsion) angewendet.^[52, 169, 170] Zu einer Lösung aus PLGA ($m = 10$ mg) in Dichlormethan ($V = 750$ μ L) wurde die Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikeldispersion ($V = 250$ μ L) aus dem ersten Syntheseschritt sowie eine wässrige Lösung von RNase-freiem acetyliertem Rinderserumalbumin (Ac-BSA, $V = 20$ μ L, $c = 20$ mg mL⁻¹) gegeben. Nach Ultraschallbehandlung für 15 s (Hielscher

UP50H, Sonotrode MS2, 70 % Amplitude, Puls 0,7) unter Eiskühlung bildete sich die primäre, milchig weiße W_1/O -Emulsion. Diese primäre W_1/O -Emulsion wurde anschließend in die kontinuierliche, mit PVA stabilisierte ($m = 30$ mg), wässrige Phase ($V = 3$ mL) überführt und erneut für 15 s mittels Ultraschall behandelt. Dabei bildete sich eine stabile, milchig-weiße Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion ($W_1/O/W_2$ -Emulsion) aus. Diese Emulsion wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt (800 U min^{-1}), bis das Dichlormethan vollständig verdampft wurde. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die Nanopartikeldispersion nahezu transparent. Der Überschuss an PVA und nicht eingeschlossener anti-eGFP-siRNA wurde anschließend mittels Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, $t = 30$ min bei 14800 U min^{-1}) und Redispergieren in Reinstwasser (insgesamt drei Mal) entfernt. Um die Verkapselungseffizienz zu bestimmen, wurde der Überstand zunächst mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) anhand einer zuvor erstellten Kalibriergeraden, bei der die Absorption bei 260 nm (y) gegen die siRNA-Konzentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$ (x) aufgetragen wurde ($y = 0,01987x$, $R^2 = 0,99989$), analysiert. Anschließend wurde die Verkapselungseffizienz nach Gleichung 4 berechnet. Die aufgereinigten und redispergierten Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikel wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich für 72 h bei 0,31 mbar und -10°C lyophilisiert.

4.1.3 Synthese von Calciumphosphat-DNA-PLGA-Nanopartikeln

Calciumphosphat-DNA-PLGA-Nanopartikel wurden analog zu Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikeln (siehe Abschnitt 4.1.2) über einen zweistufigen Syntheseprozess synthetisiert. Im ersten Syntheseschritt wurden zunächst Calciumphosphat-Nanopartikel in einer kontrollierten Fällungsreaktion nach einer modifizierten Synthese von Sokolova *et al.* hergestellt (siehe Abbildung 15).^[57, 65, 66, 80] Dafür wurden in einem Rohrreaktor Lösungen von Calciumnitrat ($c = 6,25 \text{ mM}$, $V = 105 \mu\text{L}$) und Dinatriumhydrogenphosphat ($V = 105 \mu\text{L}$, $c = 3,74 \text{ mM}$) mit einer Spritzenpumpe zusammengeführt und in eine pcDNA3-eGFP-Lösung (eGFP-DNA, $V = 40 \mu\text{L}$, $c = 3,9 \text{ mg mL}^{-1}$) getropft. Die Fließgeschwindigkeit der Calciumnitrat- und der Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung betrug jeweils $16,6 \mu\text{L s}^{-1}$ und die Verweilzeit im Rohrreaktor (Nukleationszeit)

betrug 1,3 s. Die resultierende Calciumphosphat-eGFP-DNA-Nanopartikel-dispersion wurde anschließend unter Eiskühlung für 5 min inkubiert, bevor diese im nächsten Syntheseschritt für die Verkapselung in eine PLGA-Matrix verwendet wurde.

Für die Verkapselung der Calciumphosphat-eGFP-DNA-Nanopartikel in eine PLGA-Matrix wurde eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechnik ($W_1/O/W_2$ -Emulsion) angewendet.^[52, 169, 170] Zu einer Lösung aus PLGA ($m = 10$ mg) in Dichlormethan ($V = 750$ μ L) wurde die Calciumphosphat-eGFP-DNA-Nanopartikeldispersion ($V = 250$ μ L) aus dem ersten Syntheseschritt sowie eine wässrige Lösung von Ac-BSA ($V = 20$ μ L, $c = 20$ mg mL⁻¹) gegeben. Nach Ultraschallbehandlung für 15 s (Hielscher UP50H, Sonotrode MS2, 70 % Amplitude, Puls 0,7) unter Eiskühlung bildete sich die primäre, milchig-weiße W_1/O -Emulsion. Diese primäre W_1/O -Emulsion wurde anschließend in die kontinuierliche, mit Polyvinylalkohol stabilisierte ($m = 30$ mg), wässrige Phase ($V = 3$ mL) überführt und erneut für 15 s mittels Ultraschall behandelt. Dabei bildete sich eine stabile, milchig-weiße $W_1/O/W_2$ -Emulsion aus. Diese Emulsion wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt (800 U min⁻¹), bis das Dichlormethan vollständig verdampft wurde. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die Nanopartikeldispersion nahezu transparent. Der Überschuss an PVA und nicht eingeschlossener eGFP-DNA wurde anschließend mittels Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, $t = 30$ min bei 14 800 U min⁻¹) und Redispergieren in Reinstwasser (insgesamt drei Mal) entfernt. Um die Verkapselungseffizienz zu bestimmen, wurde der Überstand zunächst mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) anhand einer zuvor erstellten Kalibriergeraden, bei der die Absorption bei 260 nm (y) gegen die DNA-Konzentration in μ g mL⁻¹ (x) aufgetragen wurde ($y = 0,02180x$, $R^2 = 0,99989$), analysiert. Anschließend wurde die Verkapselungseffizienz nach Gleichung 4 berechnet. Die aufgereinigten und redispergierten Calciumphosphat-eGFP-DNA-PLGA-Nanopartikel wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich für 72 h bei 0,31 mbar und -10 °C lyophilisiert.

4.1.4 *Layer-by-Layer*-Beschichtung von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln

4.1.4.1 *Layer-by-Layer*-Beschichtung mit Polyethylenimin

Um die Zellaufnahme und die Freisetzung aus Endosomen zu verbessern, wurden die anionischen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel, beladen mit FITC-BSA (siehe Abschnitt 4.1.1) und beladen mit siRNA (siehe Abschnitt 4.1.2) mit Polyethylenimin ($M_w = 25\,000\text{ g mol}^{-1}$, verzweigt, PEI) nach dem von G. Decher etablierten *Layer-by-Layer*-Verfahren beschichtet.^[68, 131, 171] Dafür wurden die gefriergetrockneten Nanopartikel ($m = 1,5\text{ mg}$) zunächst in Reinstwasser ($V = 1\text{ mL}$) mit Hilfe einer Pipette ohne Ultraschallbehandlung redispergiert. Die Nanopartikeldispersion wurde anschließend tropfenweise unter kräftigem Rühren in eine PEI-Lösung ($V = 1\text{ mL}$, $c = 2\text{ mg mL}^{-1}$) gegeben. Nach 30 min kontinuierlichem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Nanopartikeldispersion schließlich mittels Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, $t = 30\text{ min}$ bei $14\,800\text{ U min}^{-1}$) und Redispergieren in Reinstwasser (insgesamt drei Mal) aufgereinigt, um überschüssiges, nicht an die Partikeloberfläche adsorbiertes PEI zu entfernen. Für Zellkulturexperimente wurden die Nanopartikel schließlich in geeigneten Zellkulturmedien redispergiert.

4.1.4.2 *Layer-by-Layer*-Beschichtung mit Chitosan

Die anionischen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel, beladen mit FITC-BSA (siehe Abschnitt 4.1.1) und beladen mit siRNA (siehe Abschnitt 4.1.2), wurden analog zu der *Layer-by-Layer*-Beschichtung mit PEI (siehe Abschnitt 4.1.4.1) auch mit Chitosan beschichtet.^[68, 131, 171] Dafür wurden die gefriergetrockneten Nanopartikel ($m = 1,5\text{ mg}$) zunächst in Reinstwasser ($V = 1\text{ mL}$) mit Hilfe einer Pipette ohne Ultraschallbehandlung redispergiert. Die Nanopartikeldispersion wurde anschließend tropfenweise unter kräftigem Rühren in eine Chitosan-Lösung ($V = 1\text{ mL}$, $c = 5\text{ mg mL}^{-1}$, pH = 5 mit Essigsäure eingestellt) gegeben. Nach 30 min kontinuierlichem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Nanopartikeldispersion schließlich mittels Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, 30 min bei $14\,800\text{ U min}^{-1}$) und Redispergieren in Reinstwasser (insgesamt drei Mal) aufgereinigt, um überschüssiges, nicht an die Partikeloberfläche adsorbiertes

Chitosan zu entfernen. Für Zellkulturexperimente wurden die Nanopartikel schließlich in geeigneten Zellkulturmedien redispergiert.

4.1.5 Zellbiologische Charakterisierung der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel

4.1.5.1 Zellaufnahmestudien mittels CLSM

Um die Aufnahme der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel mit den unterschiedlichen Beschichtungen (siehe Abschnitt 4.1.4) durch Epithelzellen zu untersuchen, wurden Zellaufnahmestudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (engl.: *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) an HeLa-Zellen (Zervixkarzinom-Zelllinie) mit den fluoreszenzmarkierten Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikeln durchgeführt.

Dazu wurden HeLa-Zellen zunächst in einer 8-*well* Platte (Lab-Tek™) ausgesät ($2 \cdot 10^4$ Zellen pro *well*) und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM GlutaMAX™, Life Technologies) kultiviert. Anschließend wurden die HeLa-Zellen mit plasmid-DNA transfiziert, die für das lysosomassoziierte Membranprotein 1 (engl.: *lysosomal-associated membrane protein 1*, Lamp1) mit einem rotfluoreszierenden RFP-Marker (engl. *red fluorescent protein*, RFP) kodiert (Lamp1-RFP). Dazu wurden in jedes *well* 50 ng Lamp1-RFP plasmid-DNA und 0,3 µL Lipofectamine® 2000 (Life Technologies) gemäß der Herstellerangaben gegeben. Nach Inkubation für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen drei Mal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen. Nach weiteren 16 h Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre in DMEM (ohne Phenolrot, GlutaMAX™, Life Technologies) wurde die Nanopartikel-Dispersion zu den Zellen gegeben ($V = 20 \mu\text{L}$, $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$). Dafür wurden die in Abschnitt 4.1.1 synthetisierten unbeschichteten Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel, die mit Chitosan-beschichteten (siehe Abschnitt 4.1.4.2) sowie die mit PEI-beschichteten Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel verwendet (siehe Abschnitt 4.1.4.1). Die Nanopartikelaufnahme durch die HeLa-Zellen wurde schließlich 1 h und 3 h nach der Nanopartikelzugabe mittels CLSM untersucht.^[172] Die

mikroskopischen Aufnahmen mittels CLSM wurden von Frau Dipl. Biol. Sarah Karczewski angefertigt.

4.1.5.2 Transfektionsexperimente

Für die Bestimmung der Transfektionseffizienz von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln wurden die mit pcDNA3-eGFP funktionalisierten Calciumphosphat-eGFP-DNA-PLGA-Nanopartikel (siehe Abschnitt 4.1.3) verwendet. Dazu wurden HeLa-Zellen in DMEM (GlutaMAX™, Life Technologies) mit Zusatz von Penicillin und Streptomycin (je 100 U mL⁻¹) bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um die adhärennten Zellen schonend vom Zellkulturboden zu trennen (Trypsinierung), wurden die Zellen 12 h vor Zugabe der Nanopartikel mit Trypsin/EDTA behandelt. Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils $2,5 \cdot 10^4$ Zellen in ein *well* einer 24-*well* Platte gegeben. Zur vollständigen Adhäsion der Zellen wurden diese über Nacht ($t = 12$ h) bei den o.g. Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die gefriergetrockneten Calciumphosphat-eGFP-DNA-PLGA-Nanopartikel (siehe Abschnitt 4.1.3) in DMEM redispergiert ($c = 0,2$ mg mL⁻¹) und das Zellkulturmedium entfernt. In jedes *well* wurden schließlich 500 µL dieser Dispersion ($m = 0,1$ mg Calciumphosphat-eGFP-DNA-PLGA-Nanopartikel bzw. $m = 0,28$ µg eGFP-DNA) zu den Zellen gegeben. Nach sieben Stunden Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium erneut entfernt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde frisches Zellkulturmedium (DMEM mit den o.g. Zusätzen) hinzugegeben und die Zellen für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Danach wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Als Kontrollexperiment diente die Transfektion mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsmittel Lipofectamine® 2000 (Life Technologies). Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Dafür wurden zunächst 1 µL Lipofectamine® 2000 mit 50 µL DMEM ohne Zusatz von fötalem Kälberserum (FBS) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde pcDNA3-eGFP (1 µg) mit 50 µL DMEM ohne Zusatz von FBS gemischt. Danach wurden beide Lösungen vereint und gut durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µL dieser Mischung zusammen mit 400 µL DMEM in jedes *well* zu den

Zellen gegeben. Nach 7 h Inkubationszeit wurde das Transfektionsmedium durch frisches Zellkulturmedium (DMEM mit den o.g. Zusätzen) ersetzt und die Transfektionseffizienz 72 h nach der Zugabe des Transfektionsmittels bestimmt. Die Expression des grünfluoreszierenden Proteins (engl. *enhanced green fluorescent protein*, eGFP) wurde sowohl für die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel als auch für Lipofectamine® mittels Fluoreszenzmikroskopie (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen) untersucht. Die Transfektionseffizienz wurde schließlich mittels Gleichung 5 berechnet:[65, 67, 68]

$$TE(\%) = \frac{\text{Fluoreszierende Zellen nach Transfektion}}{\text{Zellanzahl(gesamt)}} \times 100 \% \quad (5)$$

Gleichung 5: Gleichung zur Bestimmung der Transfektionseffizienz (*TE*) in Prozent.

4.1.5.3 Genstummschaltungsexperimente

Für die Bestimmung der Genstummschaltungseffizienz wurden HeLa-Zellen, die das grünfluoreszierende Protein (engl. *enhanced green fluorescent protein*, eGFP) stabil exprimierten (sogenannte HeLa-eGFP Zellen), in DMEM mit Zusatz von Penicillin und Streptomycin (je 100 U mL⁻¹) sowie Geneticin (50 µg mL⁻¹) bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um die adhärenenten Zellen schonend vom Zellkulturboden zu trennen (Trypsinierung), wurden die Zellen 12 h vor der Zugabe der Nanopartikel mit Trypsin/EDTA behandelt. Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils 2,5·10⁴ Zellen in ein *well* einer 24-*well* Platte gegeben. Zur vollständigen Adhäsion der Zellen wurden diese über Nacht (*t* = 12 h) bei den o.g. Bedingungen kultiviert. Für die Genstummschaltungsexperimente wurden dann die Nanopartikel im Zellkulturmedium (DMEM mit den o.g. Zusätzen) redispergiert (*c* = 1 mg mL⁻¹) und je 500 µL pro *well* zu den Zellen gegeben. Nach 7 h Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde frisches Zellkulturmedium (DMEM, *V* = 500 µL) mit den o.g. Zusätzen hinzugegeben und die Zellen für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen.

Als Kontrollexperiment diene die Transfektion mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsmittel Lipofectamine® 2000. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Dafür wurden zunächst 1 µL Lipofectamine® mit 50 µL DMEM ohne Zusatz von FBS gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eGFP-siRNA ($m = 0,28 \mu\text{g}$, $c = 20 \text{ pmol}$) mit 50 µL DMEM ohne Zusatz von FBS gemischt. Danach wurden beide Lösungen vereint und gut durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µL dieser Mischung zusammen mit 400 µL DMEM in jedes Well zu den Zellen gegeben. Nach 7 h Inkubationszeit wurde das Transfektionsmedium durch frisches Zellkulturmedium (DMEM) ersetzt und die Genstummschaltungseffizienz schließlich 72 h nach der Zugabe des Transfektionsmittels bestimmt. Die Expression des grünfluoreszierenden Proteins wurde schließlich sowohl für die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel als auch für Lipofectamine® mittels Fluoreszenzmikroskopie (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen) untersucht. Die Genstummschaltungseffizienz (GE) wurde über folgende Gleichung bestimmt:^[80, 131, 173, 174]

$$GE(\%) = \frac{\left(\frac{\text{Nicht fluoreszierende Zellen}}{\text{nach Transfektion [\%]}} \right) - \left(\frac{\text{Nicht fluoreszierende Zellen}}{\text{der Kontrolle [\%]}} \right)}{\frac{\text{Fluoreszierende Zellen}}{\text{der Kontrolle [\%]}}} \times 100 \quad (6)$$

Gleichung 6: Gleichung zur Bestimmung der Genstummschaltungseffizienz (GE) in Prozent.

4.1.5.4 Zytotoxizitätsbestimmung mittels des MTT-Tests

Für die Untersuchung der Zytotoxizität der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel wurde der MTT-Test 72 h nach der Inkubation mit den Nanopartikeln durchgeführt. Der MTT-Test basiert auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT) zum wasserunlöslichen Formazan (violett). In lebenden Zellen erfolgt die Reduktion durch NADH und NADPH und ist somit von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums abhängig. Zudem kann die Reduktion in den Mitochondrien durch die Succinat-Dehydrogenase erfolgen. Als Maß für die Vitalität der Zellen dient dann der Vergleich der Absorption der lysierten Zellen

(unbehandelte Zellen als Kontrolle sowie mit Nanopartikeln behandelte Zellen) bei 570 nm (Absorptionsmaximum von Formazan).^[175]

Dazu wurden HeLa-Zellen bzw. HeLa-eGFP Zellen unter den in Abschnitt 4.1.5.2 bzw. Abschnitt 4.1.5.3 genannten Kultivierungsbedingungen kultiviert. Vor der Zugabe der Nanopartikel wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, um die adhären Zellen schonend vom Zellkulturboden zu trennen (Trypsinierung). Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils $2,5 \cdot 10^4$ Zellen in ein Well einer 24-well Platte gegeben. Zur vollständigen Adhäsion der Zellen wurden diese über Nacht ($t = 12$ h) bei den o.g. Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die gefriergetrockneten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel (mit eGFP-DNA bzw. anti-eGFP-siRNA funktionalisiert) in DMEM redispergiert ($c = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) und das Zellkulturmedium entfernt. In jedes Well wurden schließlich 500 μL dieser Dispersion ($m = 0,1 \text{ mg}$ Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel) zu den Zellen gegeben. Nach 7 h Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium erneut entfernt und die Zellen mit 300 μL MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, (MTT), $c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ in PBS:DMEM (1:4 v/v)) versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurde das MTT-Reagenz entfernt und 300 μL Dimethylsulfoxid pro well zugegeben, um das violette, wasserunlösliche Formazan zu lösen ($t = 30$ min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre). Anschließend wurden die Proben in 96-well Platten überführt ($v = 100 \mu\text{L}$ pro well) und die Absorption bei 570 nm photometrisch (Multiscan FC, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finnland) gemessen. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde die Absorption der mit Nanopartikeln behandelten Zellen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden) normiert.^[175, 176]

4.1.6 Kontinuierliche Herstellung von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln

Für die kontinuierliche Synthese der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel wurden analog zu den vorherigen Synthesen zunächst Calciumphosphat-Nanopartikel in einer kontrollierten Fällungsreaktion nach einer modifizierten Synthese von Sokolova *et al.* hergestellt (siehe Abbildung 15).^[57, 65, 66, 80] Dafür wurden in einem Rohrreaktor Lösungen von Calciumnitrat ($V = 525 \mu\text{L}$, $c = 6,25 \text{ mM}$) und Dinatriumhydrogenphosphat ($3,74 \text{ mM}$, $525 \mu\text{L}$) mit einer Spritzenpumpe zusammengeführt und in eine DNA-Lösung (fragmentierte Heringssperma-DNA $<50 \text{ bp}$, $c = 3,9 \text{ mg mL}^{-1}$, $V = 200 \mu\text{L}$) getropft. Die Fließgeschwindigkeit der Calciumnitrat- und der Dinatriumhydrogenphosphat-Lösungen betrug jeweils $16,6 \mu\text{L s}^{-1}$. Die Verweilzeit im Rohrreaktor (Nukleationszeit) betrug $1,3 \text{ s}$. Die resultierende Calciumphosphat-DNA-Nanopartikeldispersion wurde anschließend unter Eiskühlung für 5 min inkubiert, bevor diese für die Verkapselung in eine PLGA-Matrix verwendet wurde.

Im nächsten Syntheseschritt wurde diese Calciumphosphat-DNA-Nanopartikeldispersion in eine Lösung aus PLGA ($m = 56,25 \text{ mg}$) in Dichlormethan ($V = 3,75 \text{ mL}$) gegeben und kräftig durchmischt. Die resultierende grobdisperse Wasser-in-Öl-Emulsion wurde anschließend über eine Peristaltikpumpe (Fließgeschwindigkeit: $v = 3,33 \text{ mL min}^{-1}$) in die Ultraschalldurchflussszelle (UIP250-Dmini) überführt. Dabei wurde die Emulsion mittels Ultraschall kontaktfrei bei einer Amplitude von 100% und Kühlung im Eisbad homogenisiert. Dabei bildete sich eine feine Wasser-in-Öl-Emulsion. Die Verweilzeit im Glasrohr der Ultraschalldurchflussszelle betrug $t = 23 \text{ s}$. Durch Überführen in eine Ethanol-Vorlage ($V = 25 \text{ mL}$) diffundierte das Lösungsmittel (Dichlormethan) in die ethanolische Phase (Lösungsmittelverdrängung, engl.: *solvent diffusion*), und die Nanopartikel fielen aus. Nach dem vollständigen Überführen und Ausfällen der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel erfolgte die Aufreinigung mittels tangentialer Flussfiltration (engl.: *tangential flow filtration*; TFF). Dazu wurde die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel-Dispersion (in Ethanol) mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und in das Reservoir der TFF überführt. Die Dispersion wurde anschließend mittels einer Peristaltikpumpe und einem Druck von 1 bis max. 2 bar tangential an einer Polyethersulfon-Membran (Porengröße $\sim 10 \text{ nm}$, PALL®) vorbei geführt. Dabei wurde das Permeat abgeführt und das

Retentat zurück in das Reservoir gepumpt. Durch gleichzeitiges tropfenweises Zuführen von Wasser in das Reservoir (gleiches Volumen wie das abgeführte Permeat) wurde das überschüssige Ethanol entfernt. Nach 2 h war die Dispersion schließlich vollständig aufgereinigt und wurde auf 10 mL aufkonzentriert, indem dem Reservoir kein zusätzliches Wasser mehr zugeführt wurde. Die resultierende, milchig-weiße Dispersion wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich für 72 h bei 0,31 mbar und -10 °C lyophilisiert.

4.2 Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel für den Wirkstofftransport

4.2.1 Synthese von Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln

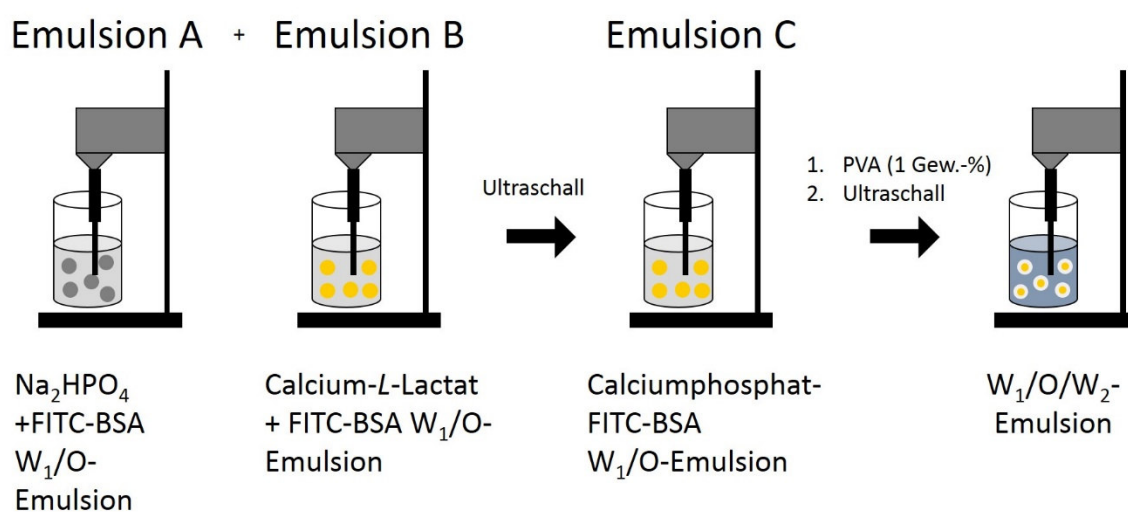


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Synthese von Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln mittels einer $\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2$ -Emulsion.

Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikel wurden über eine modifizierte Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion nach Tang *et al.*, analog zu der Synthese der Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel (siehe Abschnitt 4.1.1), synthetisiert (siehe Abbildung 16).^[168] Dafür wurden zunächst zwei separierte primäre Wasser-in-Öl-Emulsionen (W_1/O -Emulsion A und B) mittels Ultraschallbehandlung (Hielscher UP50H, Sonotrode MS2, 70 % Amplitude, Puls

0,7) hergestellt. Für Emulsion A wurde FITC-BSA ($m = 625 \mu\text{g}$) in einer wässrigen Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung ($V = 125 \mu\text{L}$, $c = 3,74 \text{ mM}$) gelöst. Diese wässrige FITC-BSA-Lösung wurde schließlich in einer Lösung von Eudragit®-E100 in Dichlormethan ($V = 375 \mu\text{L}$, $c = 13,3 \text{ mg mL}^{-1}$) mittels Ultraschallbehandlung für 20 s emulgiert. Dabei bildete sich eine milchig-gelbe W_1/O -Emulsion aus. Für Emulsion B wurde FITC-BSA ($m = 625 \mu\text{g}$) in einer wässrigen Calcium-*L*-Lactat-Lösung ($V = 125 \mu\text{L}$, $c = 6,25 \text{ mM}$) gelöst. Diese wässrige FITC-BSA-Lösung wurde schließlich in einer Lösung von Eudragit®-E100 in Dichlormethan ($V = 375 \mu\text{L}$, $c = 13,3 \text{ mg mL}^{-1}$) mittels Ultraschallbehandlung für 20 s emulgiert. Dabei bildete sich eine milchig-gelbe W_1/O -Emulsion aus. Anschließend wurden beide Emulsionen (A und B) unter Ultraschallbehandlung für 20 s vereint (Emulsion C). Diese W_1/O -Emulsion wurde anschließend tropfenweise in die kontinuierliche wässrige Phase ($V = 3 \text{ mL}$), die zusätzlich mit Polyvinylalkohol ($m = 30 \text{ mg}$) stabilisiert wurde, gegeben. Nach erneuter Ultraschallbehandlung für 20 s bildete sich eine milchig-gelbe Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion ($W_1/O/W_2$ -Emulsion) aus. Diese Emulsion wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt (800 U min^{-1}), bis das Dichlormethan vollständig verdampft wurde. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die Nanopartikeldispersion gelb und nahezu transparent. Der Überschuss an PVA und nicht eingeschlossenem FITC-BSA wurde anschließend mittels Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, $t = 30 \text{ min}$ bei $14\,800 \text{ U min}^{-1}$) und Redispergieren in Reinstwasser (insgesamt drei Mal) entfernt. Um die Verkapselungseffizienz zu bestimmen, wurde der Überstand mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 460 nm (Absorptionsmaximum von FITC-BSA) anhand einer zuvor erstellten Kalibriergeraden, bei der die Absorption bei 460 nm (y) gegen die FITC-BSA-Konzentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$ (x) aufgetragen wurde ($y = 0,0018x$, $R^2 = 0,99799$), analysiert. Die aufgereinigten und redispergierten Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikel wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich für 72 h bei 0,31 mbar und $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ lyophilisiert.

4.2.2 Synthese von Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln

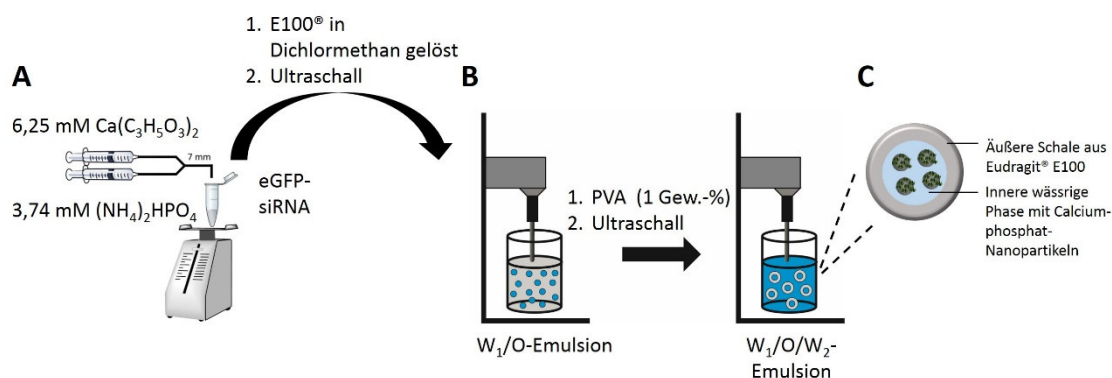


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Synthese von anti-eGFP-siRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln (A) und die VerkapSELUNG in eine Eudragit®-E100-Matrix mittels der $W_1/O/W_2$ -Emulsionstechnik (B). Modellhafte Struktur der Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel (C).

Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel wurden über einen zweistufigen Syntheseprozess analog zur Synthese von Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikeln (siehe Abschnitt 4.1.2), synthetisiert. Im ersten Syntheseschritt wurden zunächst Calciumphosphat-Nanopartikel in einer kontrollierten Fällungsreaktion nach einer modifizierten Synthese von Sokolova *et al.* hergestellt (siehe Abbildung 17).^[57, 65, 66, 80] Dafür wurden in einem Rohrreaktor Lösungen aus Calcium-L-Lactat ($V = 105 \mu\text{L}$, $c = 6,25 \text{ mM}$) und Dinatriumhydrogenphosphat ($V = 105 \mu\text{L}$, $c = 3,74 \text{ mM}$) mit einer Spritzenpumpe zusammengeführt und in eine anti-eGFP-siRNA-Lösung ($V = 40 \mu\text{L}$, $c = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) getropft. Die Fließgeschwindigkeit der Calcium-L-Lactat- und der Dinatriumhydrogenphosphat-Lösungen betrug jeweils $16,6 \mu\text{L s}^{-1}$, und die Verweilzeit im Rohrreaktor (Nukleationszeit) 1,3 s. Die resultierende Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikeldispersion wurde anschließend für 5 min im Eisbad bei 4°C gekühlt, bevor diese im nächsten Syntheseschritt für die VerkapSELUNG in eine Eudragit®-E100-Matrix verwendet wurde.

Für die VerkapSELUNG der Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikel in eine Eudragit®-E100-Matrix wurde eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechnik verwendet.^[52, 169, 170] Zu einer Lösung aus Eudragit®-E100 ($m = 10 \text{ mg}$) in Dichlormethan ($V = 750 \mu\text{L}$) wurden die Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikeldispersion ($V = 250 \mu\text{L}$) aus dem ersten Syntheseschritt sowie eine wässrige

Lösung von Ac-BSA ($V = 20 \mu\text{L}$, $c = 20 \text{ mg mL}^{-1}$) gegeben. Nach Ultraschallbehandlung für 20 s (Hielscher UP50H, Sonotrode MS2, 70 % Amplitude, Puls 0,7) unter Eiskühlung bildete sich die primäre, milchig-weiße W_1/O -Emulsion. Diese primäre W_1/O -Emulsion wurde anschließend in die kontinuierliche, mit Polyvinylalkohol stabilisierte ($m = 30 \text{ mg}$), wässrige Phase ($V = 3 \text{ mL}$) überführt und erneut für 20 s mittels Ultraschall behandelt. Dabei bildete sich eine stabile, milchig-weiße $W_1/O/W_2$ -Emulsion aus. Diese Emulsion wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt (800 U min^{-1}), bis das Dichlormethan vollständig verdampft wurde. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die Nanopartikeldispersion nahezu transparent. Der Überschuss an Polyvinylalkohol und nicht eingeschlossener anti-eGFP-siRNA wurde anschließend mittels Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, $t = 30 \text{ min}$ bei $14\,800 \text{ U min}^{-1}$) und Redispergieren in Reinstwasser (insgesamt drei Mal) entfernt. Um die Verkapselungseffizienz zu bestimmen, wurde der Überstand mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) analysiert. Anhand einer zuvor erstellten Kalibriergeraden, bei der die Absorption bei 260 nm (y) gegen die siRNA-Konzentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$ (x) aufgetragen wurde ($y = 0,0199x$, $R^2 = 0,9998$), wurde schließlich die Verkapselungseffizienz nach Gleichung 4 berechnet. Die aufgereinigten und redispergierten Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich für 72 h bei 0,31 mbar und $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ lyophilisiert.

4.2.3 Synthese von Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikeln

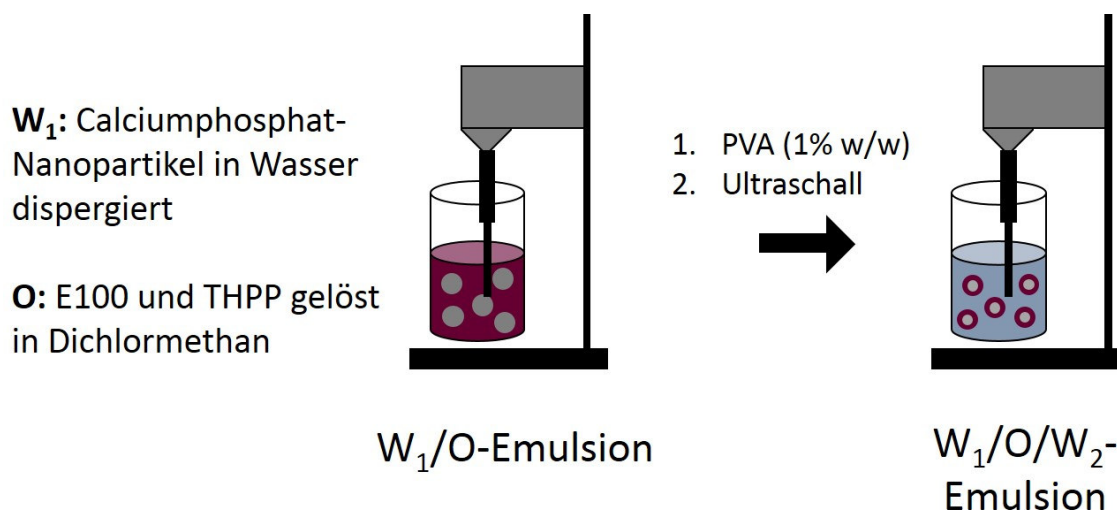


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Synthese der Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikel. (Grau) Innere wässrige Phase (W₁) mit den dispergierten Calciumphosphat-Nanopartikeln und (rot) organische Phase mit gelöstem THPP und Eudragit®-E100.

Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikel wurden über einen zweistufigen Syntheseprozess, analog zu der Synthese von Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln, synthetisiert. Im ersten Syntheseschritt wurden zunächst Calciumphosphat-Nanopartikel in einer kontrollierten Fällungsreaktion nach einer modifizierten Synthese von Sokolova *et al.* hergestellt (siehe Abbildung 18).^[57, 65, 66, 80] Dafür wurden in einem Rohrreaktor Lösungen aus Calcium-*L*-Lactat ($V = 105 \mu\text{L}$, $c = 6,25 \text{ mM}$) und Dinatriumhydrogenphosphat ($V = 105 \mu\text{L}$, $c = 3,74 \text{ mM}$) mit einer Spritzenpumpe zusammengeführt und in eine siRNA-Lösung ($V = 40 \mu\text{L}$, $c = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) getropft. Hierfür wurde als Modell für funktionelle siRNA, fragmentierte Heringssperma DNA <50 Basenpaare verwendet. Die Fließgeschwindigkeit der Calcium-*L*-Lactat- und der Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung betrug jeweils $16,6 \mu\text{L s}^{-1}$ und die Verweilzeit im Rohrreaktor (Nukleationszeit) 1,3 s. Die resultierende Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikeldispersion wurde anschließend unter Eiskühlung für 5 min bei 4 °C im Eisbad gekühlt, bevor diese im nächsten Syntheseschritt für die Verkapselung in eine Eudragit®-E100-Matrix verwendet wurde.

Für die Verkapselung der Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikel in eine rotfluoreszierende Eudragit®-E100-Matrix wurde eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechnik verwendet.^[52, 169, 170] Zunächst wurden 4 mg des rotfluoreszierenden Modellwirkstoffs 5,10,15,20-Tetrakis-(4-hydroxyphenyl)porphyrin (THPP) in 150 µL Ethanol dispergiert und anschließend zu einer Lösung aus Eudragit®-E100 ($m = 10$ mg) in Dichlormethan ($V = 750$ µL) gegeben und gut durchmischt. Danach wurden die Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikeldispersion ($V = 250$ µL) aus dem ersten Syntheseschritt sowie eine wässrige Lösung von Ac-BSA ($V = 20$ µL, $c = 20$ mg mL⁻¹) der organischen Phase hinzugegeben. Nach Ultraschallbehandlung für 20 s (Hielscher UP50H, Sonotrode MS2, 70 % Amplitude, Puls 0,7) unter Eiskühlung bildete sich die primäre, milchig-rote W₁/O-Emulsion. Diese primäre W₁/O-Emulsion wurde anschließend in die kontinuierliche, mit Polyvinylalkohol stabilisierte ($m = 30$ mg) wässrige Phase ($V = 3$ mL) überführt und erneut für 20 s mittels Ultraschall behandelt. Dabei bildete sich eine stabile, milchig-rote W₁/O/W₂-Emulsion aus. Diese Emulsion wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt (800 U min⁻¹), bis das Dichlormethan vollständig verdampft war. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die Nanopartikeldispersion nahezu transparent. Der Überschuss an Polyvinylalkohol sowie nicht eingeschlossene siRNA und nicht eingeschlossenes THPP wurden anschließend mittels Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, $t = 30$ min bei 14 800 U min⁻¹) und Redispergieren in Reinstwasser (insgesamt drei Mal) entfernt. Um die Verkapselungseffizienz von siRNA zu bestimmen, wurde der Überstand mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) anhand einer zuvor erstellten Kalibriergeraden analysiert und die Verkapselungseffizienz nach Gleichung 4 berechnet. Die aufgereinigten und redispergierten Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikel wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich für 72 h bei 0,31 mbar und -10 °C lyophilisiert. Für die Bestimmung der Verkapselungseffizienz des hydrophoben THPP wurden gefriergetrocknete Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikel in Ethanol gelöst und 30 min bei 14 800 U min⁻¹ zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge).

Der Überstand wurde schließlich mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 419 nm (Absorptionsmaximum von THPP) anhand einer zuvor erstellten Kalibriergeraden, bei der die Absorption bei 419 nm (y) gegen die THPP-Konzentration in Ethanol (x) aufgetragen wurde ($y = 0,22758$, $R^2 = 0,99802$), analysiert. Die Verkapselungseffizienz wurde schließlich mittels Gleichung 4 berechnet.

4.2.4 Zellbiologische Charakterisierung der Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel

4.2.4.1 Zellaufnahmestudien mittels CLSM

Um die Aufnahme der Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel durch Epithelzellen zu untersuchen, wurden Zellaufnahmestudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (engl.: *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) an HeLa-Zellen (Zervixkarzinom-Zelllinie) mit den grünfluoreszierenden Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100- sowie den rotfluoreszierenden Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikeln durchgeführt.

Dazu wurden HeLa-Zellen zunächst in einer 8-*well* Platte ausgesät ($2 \cdot 10^4$ Zellen pro *well*) und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre in DMEM für 24 h kultiviert. Anschließend wurde die Nanopartikel-Dispersion zu den Zellen gegeben ($V = 20 \mu\text{L}$, $c = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) und die Nanopartikelaufnahme durch die HeLa-Zellen nach 1 h, 3 h und 5 h mittels CLSM analysiert.^[172]

Für die Visualisierung des Zellkerns wurden die Zellen zuvor mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 1 h inkubiert. Die mikroskopischen Aufnahmen mittels CLSM wurden von Frau Dr. rer. nat. Diana Kozlova angefertigt.

4.2.4.2 Genstummschaltungsexperimente

Für die Bestimmung der Genstummschaltungseffizienz wurden HeLa-eGFP Zellen (siehe Abschnitt 4.1.5.3) in DMEM mit Zusatz von Penicillin und Streptomycin (je 100 U mL^{-1}) sowie Geneticin ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um die adhärenenten Zellen schonend vom Zellkultur-boden zu trennen (Trypsinierung), wurden die Zellen 12 h vor der Zugabe der Nanopartikel mit Trypsin/EDTA behandelt. Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils $2,5 \cdot 10^4$ Zellen in ein *well* einer 24-

well Platte gegeben. Zur vollständigen Adhäsion der Zellen wurden diese über Nacht ($t = 12$ h) bei den o.g. Bedingungen kultiviert. Für die Genstummschaltungsexperimente wurde dann die Nanopartikeldispersion im Zellkulturmedium (DMEM mit den o.g. Zusätzen) redispergiert ($c = 0,08$ mg mL⁻¹, $m = 3,3$ µg siRNA) und je 500 µL pro *well* zu den Zellen gegeben. Nach 7 h Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde DMEM ($V = 500$ µL) mit den o.g. Zusätzen hinzugegeben und die Zellen für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen.

Als Kontrollexperiment diente die Transfektion mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsmittel Lipofectamine® (Life Technologies). Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben (siehe Abschnitt 4.1.5.3). Die Bestimmung der Genstummschaltungseffizienz erfolgte schließlich 72 h nach der Zugabe des Transfektionsmittels. Die Expression des grünfluoreszierenden Proteins wurde sowohl für die Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel als auch für Lipofectamine® mittels Fluoreszenzmikroskopie (Keyence BZ900) untersucht. Die Genstummschaltungseffizienz (GE) wurde schließlich mit Gleichung 6 berechnet.

4.2.4.3 Zytotoxizitätsbestimmung mittels des MTT-Tests

Für die Untersuchung der Zytotoxizität der Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel wurde der MTT-Test durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen (für die Zellaufnahmestudien) bzw. HeLa-eGFP Zellen (für die Genstummschaltungsexperimente) unter den in Abschnitt 4.2.4.1 bzw. Abschnitt 4.2.4.2 genannten Bedingungen kultiviert. Um die adhärenenten Zellen schonend vom Zellkulturboden zu trennen (Trypsinierung), wurden die Zellen vor der Zugabe der Nanopartikel mit Trypsin/EDTA behandelt. Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils $2,5 \cdot 10^4$ Zellen in ein *well* einer 24-*well* Platte gegeben. Zur vollständigen Adhäsion der Zellen wurden diese über Nacht ($t = 12$ h) kultiviert. Anschließend wurden die gefriergetrockneten Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel (mit FITC-BSA, mit anti-eGFP-siRNA oder mit siRNA und THPP funktionalisiert) in DMEM in den entsprechenden Konzentrationen redispergiert und das Zellkulturmedium entfernt. In jedes *well*

wurden schließlich 500 μL dieser Dispersion zu den Zellen gegeben. Nach 7 h Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium erneut entfernt und die Zellen mit 300 μL MTT-Reagenz ($c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ in PBS:DMEM (1:4 v/v)) versetzt. Um das violette, wasserunlösliche Formazan zu lösen, wurde nach 1 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 -Atmosphäre das MTT-Reagenz entfernt und 300 μL Dimethylsulfoxid pro *well* zugegeben. Anschließend wurden die Proben in 96-*well* Platten überführt (100 μL pro *well*) und die Absorption bei 570 nm photometrisch gemessen. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde die Absorption der mit Nanopartikeln behandelten Zellen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden) normiert.^[175, 176]

4.3 Calciumphosphat-Polylactid-Mikrokompositpartikel für den Knochenersatz

4.3.1 Synthese von Polylactid-Mikrokompositpartikeln

4.3.1.1 Synthese von Vaterit-Mikropartikeln

Vaterit-Mikropartikel wurden nach einer Methode von Sarkar *et al.* synthetisiert.^[177] Hierfür wurden zunächst eine Lösung aus Calciumchlorid-Hexahydrat ($m = 109,54 \text{ g}$) in bidestilliertem Wasser ($V = 250 \text{ mL}$) und eine Lösung aus Kaliumcarbonat ($m = 69,10 \text{ g}$) in bidestilliertem Wasser ($V = 250 \text{ mL}$) hergestellt. Anschließend wurden beide Lösungen auf $T = 30 \text{ °C}$ aufgeheizt und die wässrige Calciumchlorid-Lösung ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$) mit einer Fließgeschwindigkeit von 25 mL min^{-1} unter kräftigem Rühren in die wässrige Kaliumcarbonat-Lösung ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$) gegeben. Dabei bildete sich eine gelartige Masse, die sich im weiteren Verlauf der Zugabe der Kaliumcarbonat-Lösung wieder verflüssigte, und schließlich eine weiße Dispersion bildete. Nach der vollständigen Zugabe der Kaliumcarbonat-Lösung wurde die Dispersion abfiltriert (Büchnertrichter, Whatman 40 Filterpapier) und insgesamt mit 1 L bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde noch dreimal mit Aceton gewaschen und die Vaterit-Partikel schließlich im Vakuumexsikkator getrocknet. Vor der Charakterisierung wurden die getrockneten Partikel gemörsert, bis ein feines Pulver entstand.

4.3.1.2 Synthese von Polylactid-Mikrokompositpartikeln mittels PVA-stabilisierten Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen (S/O/W-Emulsion)

Polylactid-Mikrokompositpartikel wurden über einen zweistufigen Syntheseprozess mittels einer Polyvinylalkohol-stabilisierten Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechnik (S/O/W-Emulsion) synthetisiert. Im ersten Syntheseschritt wurde zunächst das Poly(*L*-lactid-*co*-*D,L*-lactid) (RESOMER® LR704S, $m = 15$ g) in Dichlormethan ($V = 300$ mL) gelöst. Anschließend wurden die anorganischen Partikel in den entsprechenden Anteilen (siehe Tabelle 2) unter kräftigem Rühren der Polymer-Lösung hinzugegeben, so dass sich eine Dispersion bildete, die anschließend bei 60 °C unter Rückflussschaltung für 48 h kräftig gerührt wurde.

Diese Dispersion wurde zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend in eine vorgekühlte wässrige ($T = 4$ °C) Polyvinylalkohol-Lösung ($c = 3$ Gew.-%, $V = 1,2$ L) in einem Polyethylen-Schraubgefäß für Lösungsmittel (engl.: *high density polyethylene*, HDPE) mit 2,5 L Fassungsvermögen gegeben. Nach der Zugabe wurde das HDPE-Schraubgefäß sofort verschlossen und die Lösungen durch kräftiges Schütteln für 20 s emulgiert. Anschließend wurde das HDPE-Gefäß geöffnet und die Emulsion in ein Becherglas (5 L) gegeben und für 72 h kräftig (600 U min^{-1}) gerührt, bis das organische Lösungsmittel (Dichlormethan) vollständig verdampft wurde. Bis zur Sedimentation der Mikropartikel wurde die Dispersion stehen gelassen ($t = 30$ min). Der trübe Überstand wurde verworfen und die Partikel in bidestilliertem Wasser ($V = 150$ mL) redispergiert. Anschließend wurden die Mikropartikel noch mittels Zentrifugation (1000 U min^{-1} , $t = 10$ min) dreimal aufgereinigt und in bidestilliertem Wasser redispergiert und schließlich bei 37 °C getrocknet. Vor der Charakterisierung wurden die getrockneten Partikel gemörsert, bis ein feines Pulver entstand.

4.3.1.3 Synthese von Polylactid-Mikropartikeln mittels einer PVA-stabilisierten Öl-in-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion)

Als Vergleichssystem zu den Mikrokompositpartikeln wurden des Weiteren reine Polymer-Mikropartikel mittels einer O/W-Emulsion synthetisiert. Dafür wurde zunächst das Poly(*L*-lactid-*co-D,L*-lactid) (RESOMER® LR704S, $m = 30$ g) in Dichlormethan ($V = 300$ mL) gelöst. Anschließend wurde diese Lösung in eine vorgekühlte wässrige ($T = 4$ °C) Polyvinylalkohol-Lösung ($c = 3$ Gew.-%, $V = 1,2$ L) in einem HDPE-Schraubgefäß mit 2,5 L Fassungsvermögen gegeben. Nach der Zugabe wurde das HDPE-Schraubgefäß sofort verschlossen und die Lösungen durch kräftiges Schütteln für 20 s emulgiert. Anschließend wurde das HDPE-Gefäß geöffnet und die Emulsion in ein Becherglas (5 L) gegeben und für 72 h kräftig (600 U min^{-1}) gerührt, bis das organische Lösungsmittel (Dichlormethan) vollständig verdampft war. Bis zur Sedimentation der Mikropartikel wurde die Dispersion stehen gelassen ($t = 30$ min). Der trübe Überstand wurde verworfen und die Partikel in bidestilliertem Wasser ($V = 150$ mL) redispergiert. Anschließend wurden die Mikropartikel noch mittels Zentrifugation (1000 U min^{-1} , $t = 10$ min) dreimal aufgereinigt und in bidestilliertem Wasser redispergiert und schließlich bei 37 °C getrocknet. Bevor die Mikropartikel charakterisiert wurden, wurden die getrockneten Partikel gemörsert, bis ein feines Pulver entstand.

Tabelle 2: Massenverhältnisse der Komponenten für die Synthese der verschiedenen Polylactid-Mikrokompositpartikel.

Komposit	LR704S	HAP-Nanopartikel	β -TCP-Mikropartikel	Calcit-Nanopartikel	Vaterit-Mikropartikel
LR704S-nano-HAP-Mikropartikel	15 g	15 g	—	—	—
LR704S-mikro- β -TCP-Mikropartikel	15 g	—	15 g	—	—
LR704S-nano-Calcit-Mikropartikel	15 g	—	—	15 g	—
LR704S-mikro-Vaterit-Mikropartikel	15 g	—	—	—	15 g
LR704S-Polymer-Mikropartikel	30 g	—	—	—	—

4.3.1.4 Synthese der Polylactid-Mikrokompositpartikel mittels *Pickering*-Emulsionen

Die Synthese der Polylactid-Mikrokompositpartikel mittels Feststoff-stabilsierter Emulsionen, die nach ihrem Entdecker Percival Spencer Umfreville Pickering *Pickering*-Emulsionen genannt werden, erfolgte analog zur Synthese der Polylactid-Mikrokompositpartikel, die mittels einer Polyvinylalkohol-stabilisierten S/O/W-Emulsion in einem zweistufigen Syntheseprozess synthetisiert wurden.

Im ersten Syntheseschritt wurde zunächst das Polymer (LR704S, $m = 3,15$ g) in Dichlormethan ($V = 42$ mL) gelöst. Anschließend wurden zu dieser Polymerlösung Calcit-Nanopartikel ($m = 1,05$ g) unter kräftigem Rühren gegeben. Diese Dispersion wurde anschließend bei 60 °C unter Rückflusskühlung für 48 h kräftig gerührt, bis sich eine feine, milchig-weiße Dispersion bildete.

Diese Dispersion wurde zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend zu je 6 mL aliquotiert und jeweils in ein 50 mL Reaktionsgefäß aus HDPE gegeben. Zu diesen 6 mL der Dispersion wurden anschließend jeweils eine Hydroxylapatit-Nanopartikel Dispersion ($V = 24$ mL) mit unterschiedlichen Massenanteilen Hydroxylapatit-Nanopartikeln (0,04 Gew.-%, 0,09 Gew.-%, 0,11 Gew.-%, 0,12 Gew.-%, 0,13 Gew.-% bzw. 0,15 Gew.-%) gegeben und für 20 s durch kräftiges Schütteln emulgiert. Dabei bildete sich eine milchig-weiße S/O/W-Emulsion aus, die durch die Hydroxylapatit-Nanopartikel stabilisiert wurde. Diese S/O/W-Emulsion wurde anschließend in ein Becherglas (100 mL) gegeben und für 72 h kräftig gerührt, bis das Dichlormethan vollständig verdampft wurde. Anschließend wurde die Dispersion für 30 min stehen gelassen, bis die Mikropartikel sedimentierten. Der trübe Überstand wurde verworfen und die Partikel in bidestilliertem Wasser ($V = 10$ mL) redispergiert. Anschließend wurden die Mikropartikel noch mittels Zentrifugation (1000 U min^{-1} , $t = 10$ min) dreimal aufgereinigt und in bidestilliertem Wasser redispergiert und schließlich bei 37 °C getrocknet.

4.3.2 Mechanische Charakterisierung der Polylactid-Mikrokomposite

Die mechanischen Eigenschaften (E -Modul und die maximale Biegespannung) der Kompositmaterialien wurden mittels Dreipunktbiegeversuchen untersucht. Hierzu wurden aus den mittels S/O/W-Emulsion synthetisierten Mikrokomposit-

pulvern (siehe Abschnitt 4.3.1) zunächst Probekörper ($80 \cdot 10 \cdot 4 \text{ mm}^3$) gemäß der ISO-EN-Norm 178 für Kunststoffe mittels Heißpressen hergestellt. Dazu wurde das Kompositpulver (jeweils $m = 6,18 \text{ g}$) zunächst in die Pressform gegeben und bei 50 °C mit 50 kN für 15 min vorgepresst. Anschließend wurde der Druck verringert ($F = 10 \text{ kN}$) und bei 130 °C für 40 min heißgepresst.

Die Dreipunktbiegeversuche an den Probekörpern wurden anschließend gemäß der ISO-EN-Norm 178 für Kunststoffe mit einer mechanischen Prüfmaschine der Firma Shimadzu durchgeführt. Der Abstand zwischen den Auflageflächen (Stützweite bzw. *Gauge-Length*) betrug 72 mm . Die Testgeschwindigkeit des Prüfstempels betrug 2 mm s^{-1} .

Der Elastizitätsmodul der heißgepressten Werkstücke wurde schließlich anhand der Steigung ($\frac{\Delta F}{\Delta l}$) der Messkurve des Kraft-Weg-Diagramms im Proportionalitätsbereich durch folgende Gleichung (7) bestimmt:

$$E = \frac{\Delta F}{\Delta l} \cdot \frac{L^3}{4WT^3} \quad (7)$$

Gleichung 7: E : Elastizitätsmodul, F : Kraft, l : Längenänderung unter Krafteinwirkung, L : Stützweite des Probekörpers, W : Breite des Probekörpers, T : Dicke des Probekörpers.

4.3.3 Zellbiologische Charakterisierung der Polylactid-Mikrokomposite

Für die zellbiologische Charakterisierung der Polylactid-Mikrokompositpartikel wurden zunächst zylinderförmige Presslinge in einer für die Zellkulturgefäße geeigneten Größe (Durchmesser = 1 cm , Höhe = $0,25 \text{ cm}$) aus den jeweiligen Mikrokompositpulvern hergestellt. Dafür wurde das Kompositpulver zu je 200 mg in eine geeignete Pressform gegeben und anschließend bei 50 °C und 37 kN zunächst vorgepresst. Anschließend wurde der Druck verringert ($F = 7 \text{ kN}$) und bei 130 °C für 20 min heißgepresst. Die resultierenden Presslinge wurden schließlich in die *well*-Platten für die Zellkulturexperimente gegeben und dienten als Substrat für die Zellkulturexperimente.

4.3.3.1 Bestimmung der Proliferation von MC3T3-Zellen auf der Oberfläche von Polylactid-Mikrokomposit-Presslingen

Für die Untersuchung der Proliferation auf den Oberflächen der Komposit-Presslinge wurden MC3T3-Zellen in *Minimum Essential Medium* α (α -MEM) mit Zusatz von Penicillin und Streptomycin (je 100 U mL^{-1}) sowie 10 % fötalem Kälberserum (engl.: *fetal calf serum*, FCS) bei 37°C und 5 % CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Vor der Zugabe der Zellen auf die Oberfläche der Presslinge wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, um die adhärennten Zellen schonend vom Zellkulturboden zu trennen (Trypsinierung). Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils $2 \cdot 10^4$ Zellen in ein Well einer 24-well Platte (in dem der Pressling lag und somit als Substrat diente) gegeben und für 48 h bei den o.g. Bedingungen kultiviert. Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen anschließend fixiert. Dafür wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3,7 % Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen des Paraformaldehyds wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und der Zellkern mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Dazu wurde in jedes well 300 μL einer DAPI-Lösung ($c = 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin angefärbt. Nach dem Entfernen des PBS wurde der Pressling auf einem Objektträger fixiert und die Oberfläche mit einem Tropfen eines sog. *Mounting Medium* (Dako, *Fluorescent Mounting Medium*) versetzt, um das Ausbleichen der Probe zu unterdrücken.

4.3.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität der Polylactid-Mikrokompositpartikel

Für die Untersuchung der Zytotoxizität der Komposit-Presslinge mittels des MTT-Tests wurden MC3T3-Zellen in α -MEM mit Zusatz von Penicillin und Streptomycin (je 100 U mL^{-1}), sowie 10 % FCS bei 37°C unter 5 % CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Vor der Zugabe der Zellen auf die Oberfläche der Presslinge wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, um die adhärennten Zellen schonend vom Zellkulturboden zu trennen (Trypsinierung). Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils $2 \cdot 10^4$ Zellen in ein well einer 24-well Platte (in dem der Pressling liegt und somit als Substrat dient)

gegeben und für 48 h bei den o.g. Bedingungen kultiviert. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 300 μL MTT-Reagenz ($c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ in PBS: α -MEM (1:4 v/v)) versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 -Atmosphäre wurde das MTT-Reagenz entfernt und 300 μL Isopropanol pro *well* zugegeben, um das violette, wasserunlösliche Formazan zu lösen (30 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 -Atmosphäre). Anschließend wurden die Proben in 96-*well* Platten überführt ($V = 100 \mu\text{L}$ pro *well*) und die Absorption bei 570 nm photometrisch gemessen.

4.3.4 Degradationsuntersuchung bei 70 °C

Für die Untersuchung der beschleunigten Degradation der Polylactid-Mikrokompositpartikel sind in der ISO-Norm 13781 „*Poly(L-lactide) resins and fabricated forms for surgical implants - In vitro degradation testing*“ Temperaturen von 70 °C vorgegeben. Zunächst wurden die Polylactid-Mikrokompositpartikel zu Presslingen aus den jeweiligen Mikrokompositpulvern verarbeitet. Dafür wurde das Kompositpulver zu je ca. 300 mg in eine geeignete Pressform gegeben und anschließend bei 50 °C und 37 kN zunächst vorgepresst. Anschließend wurde der Druck verringert (7 kN) und bei 130 °C für 20 min heißgepresst. Die resultierenden Presslinge wurden schließlich in verschraubbare 50 mL-Gefäße gegeben und bei 70 °C in 30 mL physiologischer Kochsalzlösung ($c = 9 \text{ mg mL}^{-1}$ NaCl) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde das Gefäß entnommen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde der Pressling entnommen und der pH-Wert gemessen. Für die Bestimmung der Wasseraufnahme wurde der Pressling oberflächlich mit einem Papiertuch abgetrocknet und nass gewogen. Anschließend wurde der nasse Pressling im Trockenschrank bei 37 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und die Masse des getrockneten Presslings bestimmt. Anhand des Massenverhältnisses von getrocknetem Pressling zu nassem Pressling wurde schließlich die Wasseraufnahme in Gewichtsprozent bestimmt. Anhand der Messwerte der getrockneten Presslinge wurde zusätzlich der Massenverlust im Vergleich zur Ausgangsmasse der Presslinge ($m(t=0)$) in Gewichtsprozent bestimmt. Für jeden Messzeitpunkt wurden $N = 3$ Presslinge ausgewertet.

4.3.5 Bestimmung der Rieselfähigkeit

Die Rieselfähigkeit der Mikrokompositpartikel wurde in Anlehnung an die Methoden der Pharmacopoeia 5.0 bestimmt.^[178] Dazu wurde jeweils das gemörserte Mikrokompositpulver ($m = 20$ g) in einen verschlossenen Trichter aus Edelstahl mit polierten Innenflächen (Schüttwinkel 40°) gegeben. Anschließend wurde die Zeit gemessen, die das Pulver benötigte, um vollständig aus dem Trichter zu fließen. Der Durchmesser der Öffnung des Trichters betrug 10 mm.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel als Wirkstoffträger für Proteine und Nukleinsäuren

5.1.1 Einführung in die Thematik

Poly(*D,L*-lactid-co-glycolid) (PLGA) ist ein biokompatibles und biodegradierbares Polymer auf der Basis von Polymilchsäure und Polyglycolsäure. Wie in Abschnitt 2.2 bereits beschrieben wurde, degradiert das Polymer in seine Monomere (Milchsäure und Glycolsäure), die über den Citratzyklus leicht verstoffwechselt werden können. PLGA besitzt daher eine sehr geringe Toxizität und ist durch die Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (engl.: *Food and Drug Administration*, FDA), sowie durch die europäische Arzneimittel Agentur (engl.: *European Medicines Agency*, EMA) als Wirkstoffträger und Biomaterial zugelassen.^[52] Die Polymere sind kommerziell unter dem Handelsnamen RESOMER® in unterschiedlichen Molekulargewichten und Copolymer-Zusammensetzungen erhältlich und unterscheiden sich in ihren Degradationszeiten. Die Degradationszeiten variieren dabei von 1-3 Monaten bis hin zu 3 Jahren.

PLGA-Nanopartikel können mittels verschiedener Methoden hergestellt werden.^[179] Die am häufigsten genutzte Methode ist jedoch die Öl-in-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion), mit der hydrophobe Wirkstoffe gut in die PLGA-Matrix eingeschlossen werden können.^[180] Bei O/W-Emulsionen werden das Polymer und der Wirkstoff in einem organischen Lösungsmittel, welches nicht mit Wasser mischbar ist (z.B. Dichlormethan), gelöst. Diese organische Phase wird anschließend in eine kontinuierliche wässrige Phase überführt, die zumeist mit Tensiden (z.B. Poloxamer-188 oder Polyvinylalkohol) stabilisiert ist. Die Emulgation (Erzeugung von feinen Öltröpfchen in der kontinuierlichen wässrigen Phase) erfolgt mittels Ultraschallbehandlung oder Homogenisierungsmethoden. Nach dem Entfernen des organischen Lösungsmittels fällt das Polymer bei hinreichender Stabilisierung als Nanopartikel aus und verkapselt die hydrophoben Wirkstoffe in der Polymermatrix.

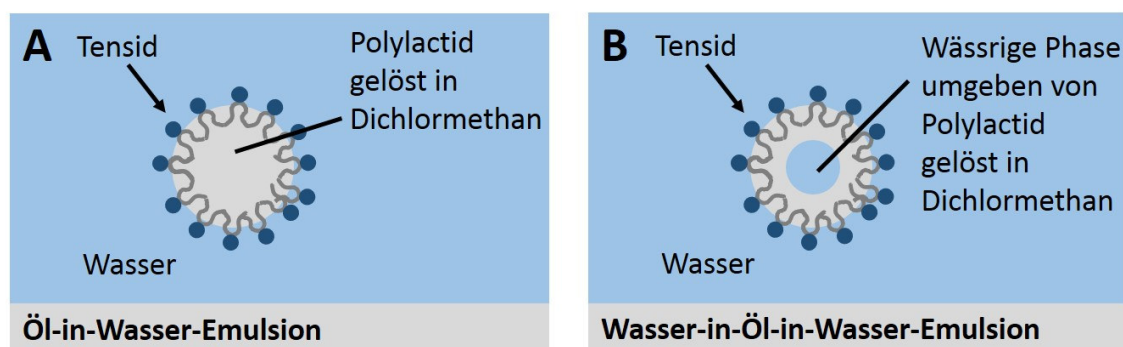


Abbildung 19: Schematische Darstellung einer Öl-in-Wasser-Emulsion (A) und einer Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion (B) am Beispiel von Polylactid.

Für die Verkapselung von hydrophilen Wirkstoffen wie Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren wird zumeist eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion ($W_1/O/W_2$ -Emulsion) verwendet, die auf den gleichen Grundprinzipien basiert, wie die O/W-Emulsion (siehe Abbildung 19). Hierbei werden jedoch die hydrophilen Wirkstoffe zunächst in Wasser gelöst und anschließend in einer organischen Phase, in der auch das Polymer gelöst ist, emulgiert, so dass eine primäre Wasser-in-Öl-Emulsion entsteht (W_1/O). Diese primäre W_1/O -Emulsion wird anschließend in eine kontinuierliche wässrige Phase (W_2) überführt und wie für die O/W-Emulsion beschrieben emulgiert. Daraus resultiert eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion ($W_1/O/W_2$ -Emulsion), bei der sich die hydrophilen Wirkstoffe in der inneren (primären) wässrigen Phase befinden und von dem organischen Lösungsmittel (in dem auch das Polymer gelöst ist) umgeben sind. Die organische Phase ist wiederum von der kontinuierlichen wässrigen Phase umgeben, welche üblicherweise mit Tensiden (z.B. Poloxamer-188 oder Polyvinylalkohol) stabilisiert ist. Entfernt man nun analog zur O/W-Emulsion das organische Lösungsmittel, so fällt das Polymer in Form von Nanopartikeln aus und verkapselt die hydrophilen Wirkstoffe in der Polymermatrix.

Wegen der guten Wasserlöslichkeit tendieren hydrophile Wirkstoffe jedoch dazu, während des Emulsionsprozesses aus der inneren wässrigen Phase (W_1) in die kontinuierliche wässrige Phase (W_2) zu diffundieren. Dies ist besonders bei der Verkapselung von hydrophilen Wirkstoffen problematisch, die zusätzlich negativ geladen sind und zudem ein geringes Molekulargewicht besitzen. So erfahren beispielsweise Nukleinsäuren, die bedingt durch das Phosphatrückgrat bei neutralem pH-Wert negativ geladen sind, eine elektrostatische Abstoßung von

den ebenfalls negativ geladenen Carboxyl-Endgruppen des Polymers, so dass keine Affinität zur PLGA-Matrix gegeben ist, und daher Verkapselungseffizienzen für anionische, hydrophile Wirkstoffe in die hydrophobe PLGA-Matrix typischerweise sehr gering sind.^[52, 181] Eine gut etablierte Strategie zur Erhöhung der Verkapselungseffizienzen von Nukleinsäuren in PLGA-Nanopartikel ist beispielsweise, Nukleinsäuren zuvor mit polykationischen Polymeren wie z.B. Polyethylenimin (PEI) zu Polyplexen oder mit Tensiden wie z.B. 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (DOTAP) zu Liposomen zu komplexieren, um so die Affinität zur hydrophoben und negativ geladenen PLGA-Matrix zu erhöhen. Dadurch ändert sich jedoch einerseits das Freisetzungs- und Degradationsprofil der PLGA-Nanopartikel und zum anderen die Toxizität der Nanopartikel, da insbesondere die polykationischen Polymere für ihre Zytotoxizität bekannt sind. Im Gegensatz dazu sind Calciumphosphat-Nanopartikel, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, als anorganischer Bestandteil des menschlichen Hartgewebes bekannt für ihre gute Biokompatibilität und werden effizient von Zellen aufgenommen. Zudem besitzen Calciumphosphat-Nanopartikel wegen der Wechselwirkung der freien Calcium-Ionen auf der Partikeloberfläche mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren und werden daher als nanopartikulärer Wirkstoffträger für den Transport von DNA und siRNA in Zellen verwendet.^[57, 62, 65, 66, 80]

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Verkapselungseffizienz von hydrophilen anionischen Biomolekülen wie siRNA, Plasmid-DNA und Proteinen in PLGA-Nanopartikel durch die Adsorption an Calciumphosphat-Nanopartikel zu erhöhen. Durch die Verkapselung in die Polymermatrix sollten die sensitiven Wirkstoffe zusätzlich vor enzymatischer Degradation geschützt und zudem die Lagerstabilität der Calciumphosphat-Nanopartikel verbessert werden (siehe Abbildung 20). Im Folgenden werden zunächst die Synthese und die kolloid-chemische Charakterisierung der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel gezeigt und zudem die Verkapselungseffizienzen der o.g. Biomoleküle mit reinen PLGA-Nanopartikeln verglichen. Abschließend wird die biologische Wirksamkeit der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel in Zellkulturexperimenten untersucht.

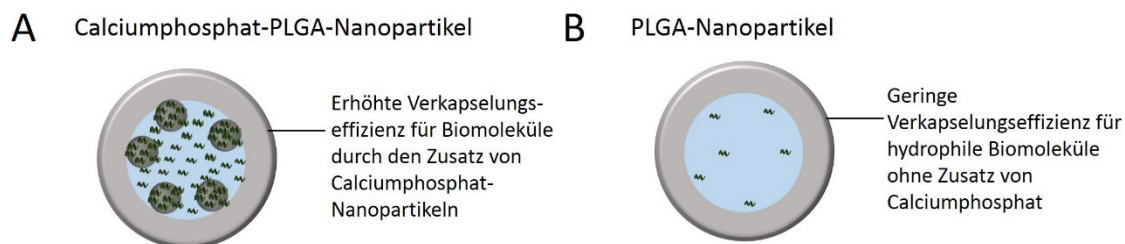


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Prinzips der erhöhten Verkapselungseffizienz für hydrophile Biomoleküle durch Calciumphosphat-Nanopartikel (A) im Vergleich zu reinen PLGA-Nanopartikeln (B).

5.1.2 Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel

Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel wurden über eine modifizierte Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion ($W_1/O/W_2$ -Emulsion) nach Tang *et al.* synthetisiert (siehe Abbildung 14 in Abschnitt 4.1.1).^[168] Für die Verkapselung von Wirkstoffen, die an Calciumphosphat-Nanopartikel adsorbieren, diese aber nicht kolloidal stabilisieren, muss die Fällung der Calciumphosphat-Nanopartikel während des Emulsionsprozesses erfolgen. Gemäß der Arbeiten von Landfester *et al.* ist es möglich, anorganische Salze in den inneren wässrigen Phasen (Tröpfchen) einer primären W_1/O -Emulsion auszufällen.^[182, 183] Daher wurden für die Verkapselung von FITC-BSA zunächst zwei separate primäre W_1/O -Emulsionen (Emulsion A und B) mittels Ultraschallbehandlung hergestellt. Emulsion A enthielt den Wirkstoff (FITC-BSA) und das Phosphat-Salz (Dinatriumhydrogenphosphat) in der inneren wässrigen Phase, umgeben von der organischen Phase (PLGA gelöst in Dichlormethan). Emulsion B enthielt ebenfalls den Wirkstoff (FITC-BSA) sowie das Calcium-Salz (Calciumchlorid) in der inneren wässrigen Phase, umgeben von der organischen Phase (PLGA gelöst in Dichlormethan). Anschließend wurden Emulsion A und B unter Ultraschallbehandlung gemischt, so dass sich Emulsion C (siehe Abbildung 14) bildete und Calciumphosphat-Nanopartikel in den Tröpfchen der inneren wässrigen Phase ausfielen. Hierbei wurde das Kristallwachstum durch das kleine Volumen der inneren wässrigen Phase limitiert, so dass die Wassertröpfchen als eine Art Mikroreaktor dienten, in denen die Bildung der Calciumphosphat-Nanopartikel räumlich begrenzt stattfand. Interessanterweise bildeten sich ohne Zusatz von FITC-BSA kolloidal instabile Calciumphosphat-Agglomerate, die im

Reaktionsgefäß sedimentierten. FITC-BSA, ein FITC-markiertes Serumalbumin, besitzt also neben seiner therapeutischen Wirksamkeit auch Emulsions-stabilisierende Eigenschaften für die W_1/O -Emulsionen.^[181] Albumine, die zu der Klasse der Serumproteine gehören, wirken im Serum als Lösungsvermittler für wasserunlösliche Stoffe (vor allem für langkettige Fettsäuren) und agieren im menschlichen Körper als natürliches Tensid. Nach der Vereinigung der Emulsionen A und B zu Emulsion C wurde Emulsion C schließlich in eine kontinuierliche wässrige Phase gegeben, die zusätzlich mit 1 % Polyvinylalkohol stabilisiert wurde. Nach der Behandlung mit Ultraschall bildete sich schließlich eine stabile, milchig gelbe $W_1/O/W_2$ -Emulsion. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels fiel das Polymer aus und schloss die FITC-BSA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel im Inneren der Polymermatrix mit ein. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die Nanopartikeldispersion gelb und nahezu transparent. Die mittels Zentrifugation und Redispersion aufgereinigten Nanopartikel wurden schließlich lyophilisiert und im Anschluss daran kolloidchemisch charakterisiert.

5.1.2.1 Kolloid-chemische Charakterisierung der Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel

Die gefriergetrockneten Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel ließen sich durch die Zugabe von Wasser und kräftigem Pipettieren ohne Zusatz von Kryoprotektoren gut redispergieren. Somit war der Einsatz eines Ultraschall-dispersers nicht notwendig.

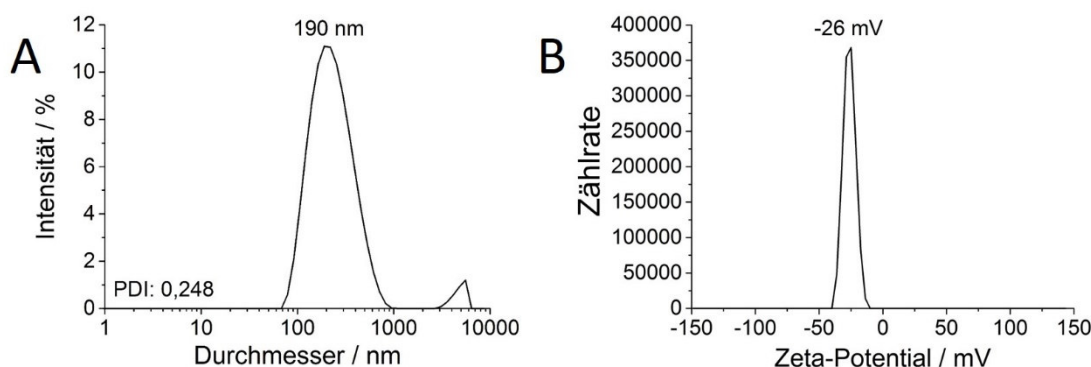


Abbildung 21: Messkurve (A) der dynamischen Lichtstreuung und (B) der Zeta-Potentialverlauf der Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel.

Die Messkurve der Größenverteilung der dynamischen Lichtstreuung (Abbildung 21A) der redispergierten Nanopartikel zeigt ein monodisperses System mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 190 nm und einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,248. Zur Bestimmung der Oberflächenladung wurde der Verlauf des Zeta-Potentials gemessen (Abbildung 21B). Bedingt durch die endständigen Carboxylgruppen des Polymers besitzen die Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel mit einem Zeta-Potential von -26 mV eine negativ geladene Partikeloberfläche.

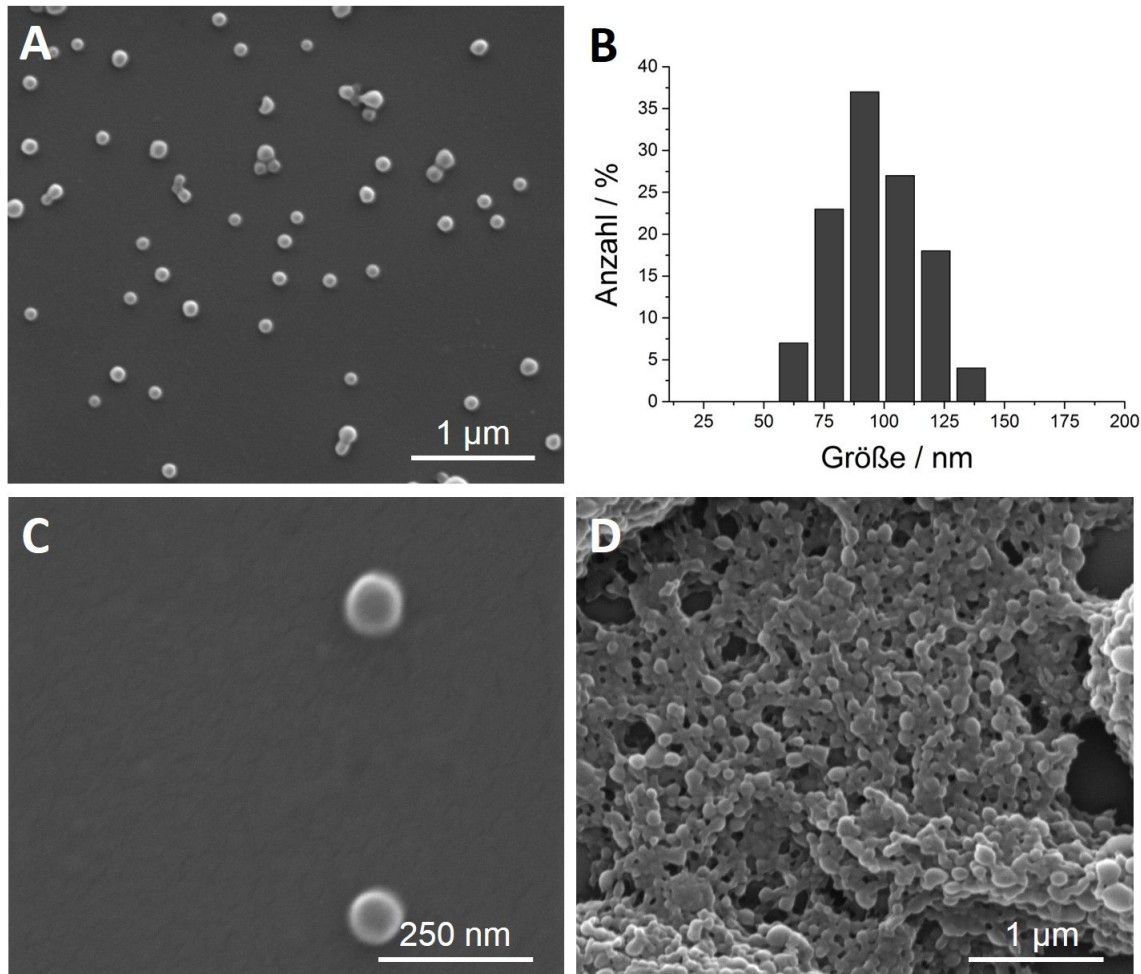


Abbildung 22: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme (A), die Größenverteilung (B), sowie eine Nahaufnahme bei 300000-facher Vergrößerung der redispergierten Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel (C). (D) zeigt eine Übersichtsaufnahme des gefriergetrockneten Pulvers.

Zur Bestimmung der Partikelmorphologie wurden von den gefriergetrockneten und anschließend redispergierten Nanopartikeln rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der redispergierten Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel (Abbildung 22A-C) zeigen monodisperse kugelförmige Nanopartikel im Größenbereich von 105 ± 18 nm, die separiert voneinander und nicht agglomeriert vorliegen. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des gefriergetrockneten Pulvers (Abbildung 22D) zeigt agglomerierte, aber diskrete Nanopartikel im gleichen Größenbereich. Die Partikelmorphologie ist mit der der redispergierten Nanopartikel vergleichbar. Diese Ergebnisse der kolloidchemischen Charakterisierung unterstreichen

chen die gute Lagerstabilität der Calciumphosphat-Nanopartikel und zeigen, dass mit der $W_1/O/W_2$ -Emulsionstechnik Nanopartikel in einem Größenbereich von ca. 200 nm dargestellt werden können, der für eine endozytotische Aufnahme durch Zellen geeignet ist.^[8, 57, 83, 84, 97, 184-187]

5.1.3 Nukleinsäure-beladene Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel

5.1.3.1 Synthese von Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln

Für die Synthese von Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln wurden zunächst Calciumphosphat-Nanopartikel mit einer modifizierten, kontrollierten Fällungsreaktion nach Sokolova *et al.* synthetisiert (Abbildung 15A in Abschnitt 4.1.2).^[57, 65, 66, 80] In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass die negativ geladenen Nukleinsäuren (DNA oder siRNA) dabei an die Oberfläche der gerade gefällten Calciumphosphat-Nanopartikel adsorbieren.^[57, 65, 66, 80] Die Nukleinsäuren inhibieren durch die Adsorption an die Oberfläche der Nanopartikel ein weiteres Kristallwachstum der Partikel und stabilisieren die Nanopartikeldispersion zudem durch ihre Ladung und ihren sterischen Anspruch elektrosterisch. Dadurch besitzen die Nukleinsäuren in diesem Fall neben ihrer therapeutischen Wirksamkeit auch stabilisierende Eigenschaften, welche die Nanopartikeldispersion vor Agglomeration schützen. Um die Nukleinsäuren auf der Oberfläche der Calciumphosphat-Nanopartikel zusätzlich vor der Degradation durch Enzyme wie DNasen und RNasen, zu schützen, wurden die Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel zusätzlich mittels einer $W_1/O/W_2$ -Emulsionstechnik in eine PLGA-Matrix eingebracht (Abbildung 15B). Die wässrige Dispersion der Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurde hierfür als innere wässrige Phase (W_1) im Emulsionsprozess verwendet. Das Polymer wurde in Dichlormethan gelöst und diente als organische Phase (O). Nach der Behandlung mittels Ultraschall bildete sich eine milchig-weiße, primäre W_1/O -Emulsion aus. Dabei befanden sich die Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel in den feinen Wassertröpfchen in der organischen Phase. Anschließend wurde die W_1/O -Emulsion in eine kontinuierliche wässrige Phase (1 % PVA in Wasser gelöst) überführt. Nach weiterer Ultraschallbehandlung bildete sich eine stabile, milchig-weiße $W_1/O/W_2$ -Emulsion aus. Nach

dem Entfernen des Lösungsmittels fiel das Polymer schließlich nanopartikulär aus und schloss die Calciumphosphat-Nanopartikel in die Polymermatrix mit ein. Die mittels Zentrifugation und Redispersion aufgereinigten Nanopartikel wurden schließlich lyophilisiert und im Anschluss kolloidchemisch charakterisiert.

5.1.3.2 Kolloidchemische Charakterisierung der Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln

Auch die mit Nukleinsäure-beladenen und gefriergetrockneten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel ließen sich ohne Zusatz von Kryoprotektoren gut redispersieren. Auch hier war der Einsatz des Ultraschalldispersers nicht notwendig. Das ist vorteilhaft, weil somit die mechanische Beanspruchung minimiert wird.

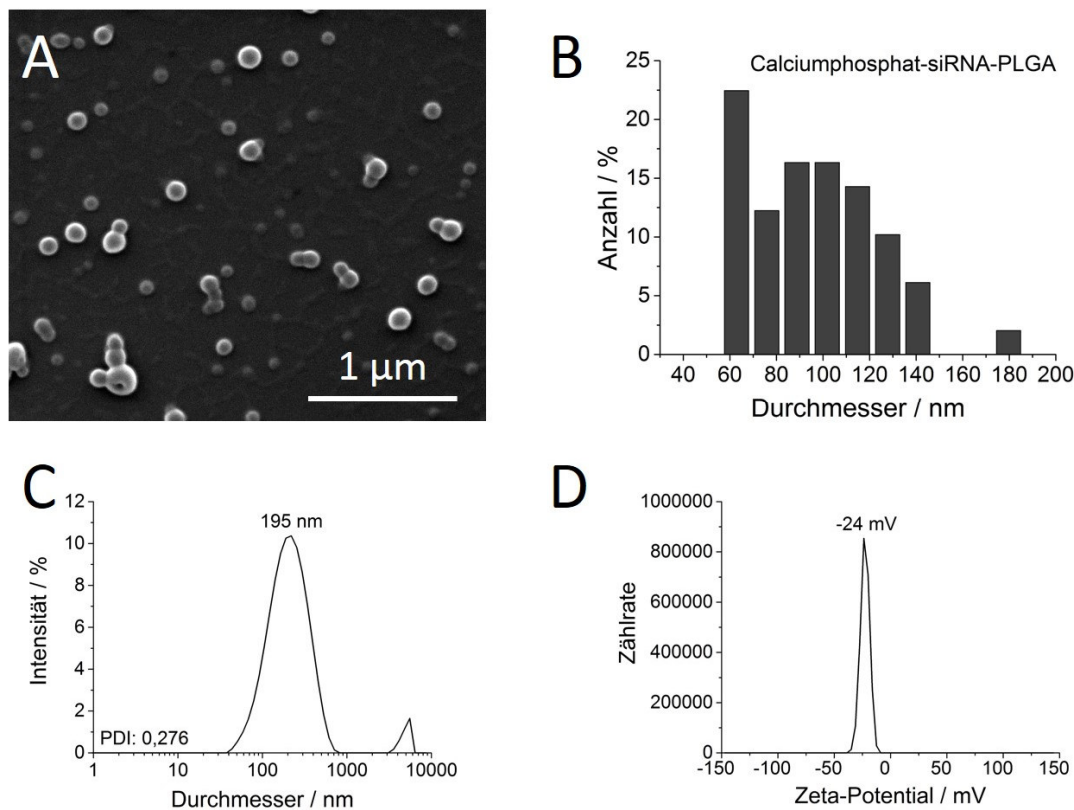


Abbildung 23: Kolloidchemische Charakterisierung der Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (A) und die mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmte Partikelgrößenverteilung (B), sowie die Messkurven der Größenverteilung (C) und des Zeta-Potentials (D) der dynamischen Lichtstreuung.

Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der redispergierten Calciumphosphat-Nukleinsäure-Nanopartikel (Abbildung 23A) zeigt kugelförmige Nanopartikel im Größenbereich von 96 nm (Abbildung 23B), die separiert voneinander und nicht agglomeriert vorliegen. Die Messkurve der Größenverteilung der dynamischen Lichtstreuung (Abbildung 23C) der redispergierten Nanopartikel zeigt ein monodisperses System mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 195 nm und einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,276. Zur Bestimmung der Oberflächenladung wurde der Verlauf des Zeta-Potentials gemessen (Abbildung 23D). Bedingt durch die endständigen Carboxylgruppen des Polymers besitzen die Calciumphosphat-Nukleinsäure-PLGA-Nanopartikel mit einem Zeta-Potential von -24 mV eine negative Oberflächenladung.

Die Ergebnisse der kolloidchemischen Analyse zeigen, dass auch die mittels einer kontrollierten Fällungsreaktion nach Sokolova *et al.* synthetisierten, Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel mittels $W_1/O/W_2$ -Emulsionstechniken in eine Matrix aus PLGA eingebracht werden können. Die resultierenden Calciumphosphat-Nukleinsäure-PLGA-Nanopartikel zeigten sowohl für die verwendete siRNA als auch für die verwendete Plasmid-DNA eine gute Lagerstabilität. Zudem konnten die Nanopartikel in einem Größenbereich hergestellt werden, der für die endozytotische Aufnahme der Nanopartikel geeignet ist.^[8, 57, 83, 84, 97, 184-187]

5.1.4 Bestimmung der Verkapselungseffizienzen von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln für FITC-BSA, Plasmid-DNA und siRNA

In der modernen Galenik ist neben der Größe und Morphologie eines nanopartikulären Wirkstoffträgers die Verkapselungseffizienz, speziell für teure (bio-)pharmazeutische Wirkstoffe, von besonderem Interesse.^[181] Wie in Abschnitt 5.1.1 erläutert wurde, ist die Verkapselungseffizienz der hydrophoben RESOMER®-Polymere (Polyester) für hydrophile Wirkstoffe typischerweise gering. Daher wurden für Wirkstoffe, welche an Calciumphosphat-Nanopartikel adsorbieren, diese aber nicht stabilisieren (wie z.B. FITC-BSA), Calciumphosphat-Nanopartikel während des Emulsionsprozesses in der inneren wässrigen Phase einer Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion präzipitiert. Dabei adsorbierte FITC-BSA an der Oberfläche der Nanopartikel. Calciumphosphat-Nanopartikel können wiederum effizient in eine PLGA-Matrix eingeschlossen werden, da sie sich während des Emulsionsprozesses an der Grenzflächen zwischen organischer Phase und wässriger Phase anlagern, so dass die Verkapselungseffizienz für FITC-BSA durch den Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln erhöht werden konnte.^[168, 188-191] Um die Verkapselungseffizienz von hydrophilen Wirkstoffen in die PLGA-Matrix zu erhöhen, die an Calciumphosphat-Nanopartikel adsorbieren und diese auch kolloidal stabilisieren (wie z.B. Nukleinsäuren), wurden zunächst Calciumphosphat-Nanopartikel mit einer kontrollierten Fällungsreaktion nach Sokolova *et al.* synthetisiert. Die wässrige Nanopartikel-Dispersion wurde anschließend als wässrige Phase im Emulsionsprozess verwendet und die an die Calciumphosphat-Nanopartikel adsorbierten Nukleinsäuren effizient in die PLGA-Matrix eingeschlossen. Mit Hilfe von Kalibriergeraden (siehe Abbildung 24) und Gleichung 4 wurden die Verkapselungseffizienzen für die verwendeten Biomoleküle (FITC-BSA, siRNA und Plasmid-DNA) bestimmt und mit PLGA-Nanopartikeln verglichen (Abbildung 25). Um Querempfindlichkeiten mit PVA zu verhindern, wurden die Proben mit einer Referenzmessung (1 % PVA) korrigiert. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurden definierte Konzentrationen der Biomoleküle mittels UV/Vis-Spektroskopie vermessen und die Absorption bei den jeweiligen Absorptionsmaxima gegen die Biomolekül-Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe des Programms *Origin* wurde schließlich eine lineare Anpassung durchgeführt und eine Ausgleichsgerade durch die gemessenen Werte gelegt. Um die

Konzentration des Biomoleküls im Überstand zu bestimmen, wurde die gemessene Absorption beim jeweiligen Absorptionsmaximum mit Hilfe der entsprechenden Geradengleichungen der Ausgleichsgeraden in die Biomolekül-Konzentration umgerechnet.

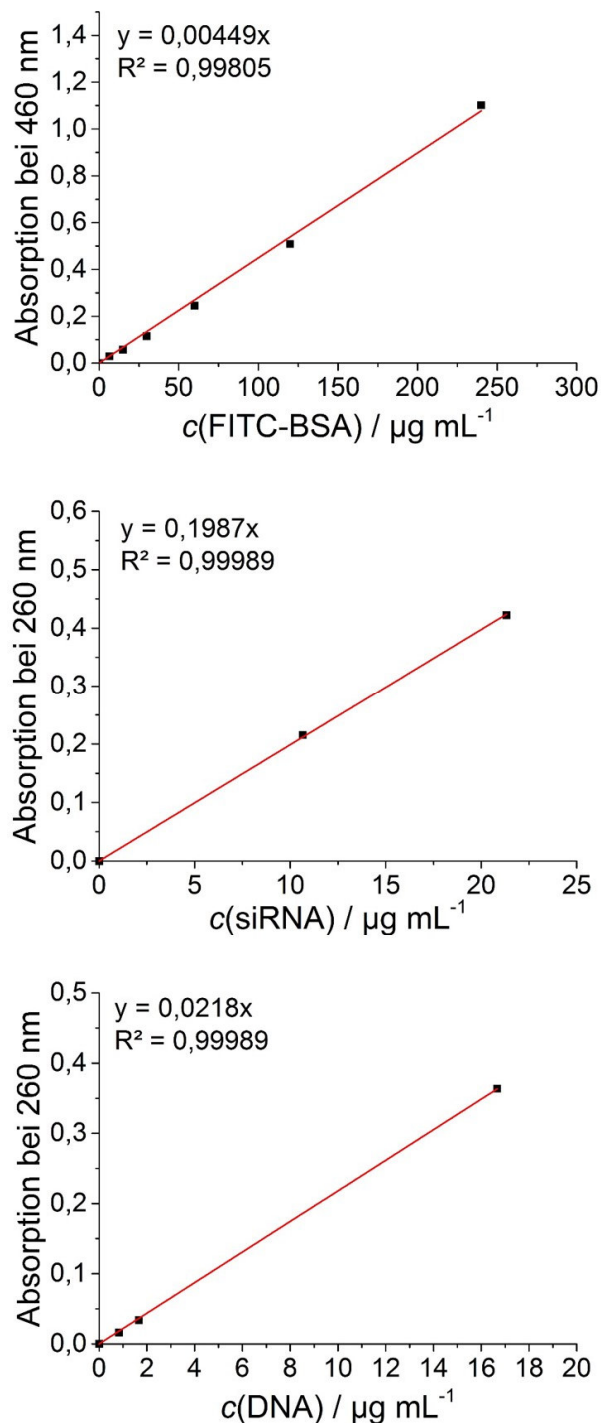


Abbildung 24: Mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmte Kalibriergeraden für die in die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel verkapselten Biomoleküle.

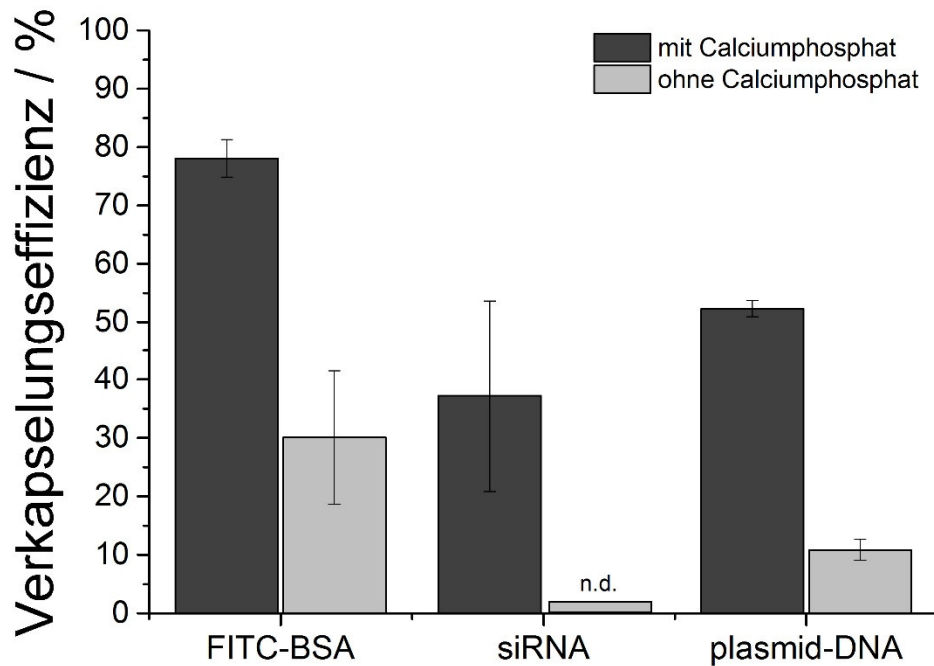


Abbildung 25: Verkapselungseffizienzen der verwendeten Biomoleküle (FITC-BSA, siRNA und plasmid-DNA) mit (dunkelgrau) und ohne (grau) Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln. Ohne Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde keine siRNA verkapselt (nicht detektierbar, n.d.).

Die Verkapselungseffizienz von FITC-BSA konnte durch den Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln von 30 % auf 78 % gesteigert werden. Dies entspricht 280 µg FITC-BSA pro mg PLGA-Nanopartikel. Ohne Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde in allen durchgeführten Experimenten keine siRNA in PLGA-Nanopartikel eingeschlossen. Durch Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln konnte die Verkapselungseffizienz jedoch von 0 % auf 37 % gesteigert werden. Dies entspricht 8 µg siRNA pro mg PLGA-Nanopartikel. Die Verkapselungseffizienz von Plasmid-DNA konnte von 11 % auf 52 % durch den Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln gesteigert werden. Dies entspricht 5 µg Plasmid-DNA pro mg PLGA-Nanopartikel. Zusätzlich wurde noch die Anzahl an Wirkstoffmolekülen pro Nanopartikel berechnet. Dafür wurde zunächst die Anzahl an Nanopartikeln pro m³ mit Gleichung 8 berechnet.

$$N(\text{Nanopartikel}) = \frac{m(\text{CaP-PLGA})}{m(\text{NP})} = \frac{3 \cdot m(\text{CaP-PLGA})}{4 \cdot \pi \cdot r(\text{NP})^3 \cdot \rho(0.05 \cdot \rho(\text{CaP}) + 0.95 \cdot \rho(\text{PLGA}))} \quad (8)$$

Gleichung 8: Gleichung zur Bestimmung der Anzahl an Nanopartikeln pro m³ Dispersion. $N(\text{Nanopartikel})$: Anzahl an Nanopartikeln pro m³; $m(\text{CaP-PLGA})$: Masse der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel pro m³ $m(\text{CaP-PLGA}) = 1,0 \text{ kg m}^{-3}$; $m(\text{NP})$: Masse eines Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikels $m(\text{NP}) = 7,5 \cdot 10^{-19} \text{ kg}$; $r(\text{NP})$: Durchschnittlicher Radius der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel $r(\text{NP}) = 50 \cdot 10^{-9} \text{ m}$; $\rho(\text{CaP})$: Dichte von Hydroxylapatit $\rho(\text{CaP}) = 3140 \text{ kg m}^{-3}$; $\rho(\text{PLGA})$: Dichte von PLGA mit $\rho(\text{PLGA}) = 1340 \text{ kg m}^{-3}$.

Anschließend wurde die Anzahl an Wirkstoffmolekülen pro Kubikmeter anhand der Werte für die Verkapselungseffizienzen und mit Gleichung 9 berechnet.

$$N(\text{Wirkstoffmoleküle}) = c(\text{Wirkstoffmoleküle}) \cdot N_A \quad (9)$$

Gleichung 9: Gleichung zur Bestimmung der Anzahl an Wirkstoffmolekülen pro Kubikmeter Dispersion. $N(\text{Wirkstoffmoleküle})$: Anzahl an an Wirkstoffmolekülen pro m³; $c(\text{Wirkstoffmoleküle})$: Konzentration der Wirkstoffmoleküle in der Nanopartikeldispersion; N_A : Avogadrokonstante $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

Aus dem Verhältnis von Wirkstoffmolekülen pro m³ und der Anzahl von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln pro m³ (Gleichung 10) wurde schließlich die Anzahl an Wirkstoffmolekülen pro Nanopartikel berechnet.

$$N\left(\frac{\text{Wirkstoffmoleküle}}{\text{Nanopartikel}}\right) = \frac{N(\text{Wirkstoffmoleküle})}{N(\text{Nanopartikel})} \quad (10)$$

Gleichung 10: Gleichung zur Bestimmung der Wirkstoffmoleküle pro Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel. $N(\text{Wirkstoffmoleküle})$: Anzahl an an Wirkstoffmolekülen pro m³; $N(\text{Nanopartikel})$: Anzahl an Nanopartikeln pro m³.

Daraus resultieren 1880 Moleküle FITC-BSA, 255 Moleküle siRNA und 0,6 Moleküle Plasmid-DNA pro Partikel. Auf den ersten Blick wirken die Werte der berechneten Molekülanzahl pro Nanopartikel, insbesondere für Nukleinsäuren, sehr gering. In der Literatur werden jedoch für reine PLGA-Nanopartikel Werte von weniger als 1 µg Nukleinsäure pro Milligramm PLGA-Nanopartikel angegeben.^[52, 181] Für PEI-Nukleinsäure-Polyplexe, welche in PLGA-Nanopartikel (PEI-Nukleinsäure-PLGA-Nanopartikel) verkapselt wurden, werden Werte von 5-10 µg Nukleinsäure pro Milligramm PLGA-Nanopartikel angegeben.^[192] Verglichen mit den Literaturwerten für reine PLGA-Nanopartikel konnte die Anzahl der Nukleinsäure-Moleküle durch den Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln also ca. um den Faktor 10 erhöht werden und befindet sich im gleichen Bereich wie es für PEI-Nukleinsäure-PLGA-Nanopartikel angegeben wurde.^[52]

Da bei der Berechnung der Anzahl der Moleküle pro Nanopartikel jedoch einige vereinfachte Annahmen gemacht werden, ist das Ergebnis fehlerbehaftet. Beispielsweise wird bei der Berechnung von einer perfekt kugelförmigen Morphologie der Nanopartikel ausgegangen. Zudem wird der verwendete Radius anhand der REM-Aufnahmen abgeschätzt. Da das Volumen der Nanopartikel (kugelförmig) mit der dritten Potenz des Radius zunimmt, ergeben geringe Ungenauigkeiten bei der Abschätzung der Größe der Nanopartikel große Abweichungen bei Anzahl der Moleküle pro Nanopartikel. Aufgrund dieser vereinfachten Annahmen wird der Fehler bei der Berechnung der Molekülanzahl pro Nanopartikel auf ca. 30 % geschätzt.

5.1.5 Layer-by-Layer-Beschichtung mit polykationischen Polymeren

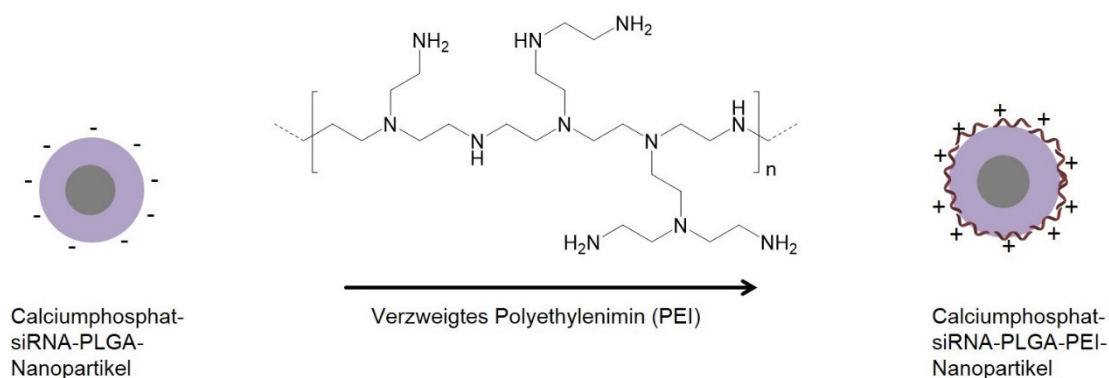


Abbildung 26: Schematische Darstellung der *Layer-by-Layer*-Beschichtung von anionischen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln mit polykationischen Polymeren (hier mit verzweigtem Polyethylenimin).

Polykationische Polymere werden in der Literatur häufig für die Transfektion von Zellen verwendet.^[92, 98, 99, 109, 193, 194] Zumeist werden hierbei Nukleinsäuren von polykationischen Polymeren komplexiert, so dass Nukleinsäuren vor enzymatischem Verdau durch DNasen oder RNasen geschützt werden und der Polymer-Nukleinsäure-Komplex zudem durch den eingesetzten Polymerüberschuss kationisch geladen ist. Durch den kationischen Charakter des Polymer-Nukleinsäure-Komplexes besitzen diese eine hohe Affinität zu der negativ geladenen Zellmembran und werden effektiv von Zellen aufgenommen. Des Weiteren sind polykationische Polymere dafür bekannt, den sogenannten Protonenschwammeffekt auszulösen und mit der Zellmembran zu fusionieren, so dass die Nukleinsäuren den Endo- und Lysosomen entkommen können (engl.: *endosomal escape*) und im Zytosol bzw. dem Zellkern ihre Wirkung entfalten. Um die Zellaufnahme der negativ geladenen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel, entweder beladen mit FITC-BSA oder Nukleinsäuren, zu verbessern, wurden in dieser Arbeit Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel mit Chitosan (Chit) und Polyethylenimin (PEI), in Anlehnung an das von G. Decher *et al.* etablierte *Layer-by-Layer*-Verfahren beschichtet (siehe Abbildung 26).^[64, 171]

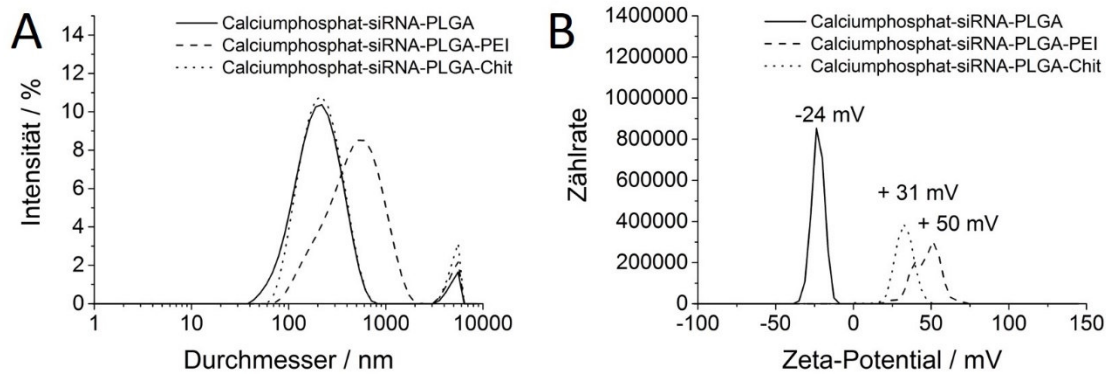


Abbildung 27: Messkurven der Größenverteilung der dynamischen Lichtstreuung (A) sowie der Bestimmung des Zeta-Potentials (B) der unbeschichteten, mit PEI-beschichteten und mit Chitosan-beschichteten Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikel.

Die Messkurven der Größenverteilung der dynamischen Lichtstreuung (Abbildung 27A) zeigen, dass sich der hydrodynamische Durchmesser der PEI-beschichteten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel im Vergleich zu unbeschichteten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln nicht geändert hat. Die Messkurve der Chitosan-beschichteten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigt hingegen eine wesentlich breitere Größenverteilung (PDI von 0,420) und mit 411 nm einen deutlich größeren *Z-Average* im Vergleich zu unbeschichteten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln und daher eine nur unzureichende kolloidale Stabilität. Die Chitosan-beschichteten Calciumphosphat-Nanopartikel waren zudem nur in leicht saurem Medium (pH = 5) redispergierbar. Die Messkurven des Zeta-Potentialverlaufs (Abbildung 27B) zeigen, dass die negativ geladenen Calciumphosphat-Nanopartikel (Zeta-Potential von -24 mV) erfolgreich mittels des *Layer-by-Layer*-Verfahrens umgeladen werden konnten. Das Zeta-Potential der mit PEI-beschichteten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel betrug nach der Umladung und mehrfachen Aufreinigung +31 mV und das der Chitosan-beschichteten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel +50 mV (bei pH = 5). Trotz des geringeren Zeta-Potentials waren die mit PEI-beschichteten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel kolloidal stabiler als die mit Chitosan-beschichteten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel. Im Folgenden sollte nun in zellbiologischen Experimenten untersucht werden, ob die Oberflächenbeschichtung der mittels des *Layer-by-Layer*-Verfahren

umgeladenen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel einen Einfluss auf die Nanopartikelaufnahme und die biologische Wirksamkeit in Transfektions- und Genstummschaltungsexperimenten hat.

5.1.6 Untersuchung der biologischen Effekte im Zellkulturexperiment

5.1.6.1 Zellaufnahmestudien mittels CLSM

In der Literatur werden für PLGA-Nanopartikel verschiedene Endozytose-Aufnahmemechanismen, abhängig von der Zelllinie und der Oberflächenladung der Nanopartikel, beschrieben.^[84] Für *vascular smooth muscle cells* (VSMC) wurde ein Clathrin-abhängiger Aufnahmemechanismus beschrieben,^[195] während für corneale Epithelzellen von Ratten Clathrin- und Caveolae-unabhängige Aufnahmemechanismen beschrieben wurden.^[196] Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei der Aufnahme durch VSMCs 85 % der Nanopartikel über Exozytose wieder aus den Zellen geschleust werden und die übrigen 15 % effektiv den Endo-/Lysosomen entkommen.^[195, 196] Durch Umladung der Partikeloberfläche mit Poly-L-Lysin konnte die Affinität der Nanopartikel zur Zellmembran stark erhöht werden. Dadurch wurden die PLGA-Nanopartikel wesentlich schneller und effektiver internalisiert, so dass der Wirkstofftransport in das Zytosol der Zelle wesentlich effektiver war als für unbeschichtete Nanopartikel.^[197]

Ein wichtiger Schritt beim Transport von Wirkstoffen mittels nanopartikulärer Wirkstoffträger ist also neben dem Zelleintritt auch die Freisetzung des Wirkstoffs aus den Endo- und Lysosomen in das Zytosol der Zelle. Mit Zellaufnahmestudien, in denen die Co-Lokalisierung von fluoreszierenden Nanopartikeln und fluoreszenzmarkierten Endosomen und Lysosomen untersucht wird, kann die Freisetzung der Nanopartikel aus den Endosomen und Lysosomen, bzw. die Fähigkeit des Wirkstoffträgers den sogenannten Protonenschwammeffekt auszulösen, getestet werden. Für diese Co-Lokalisierungsexperimente werden Zellkompartimente, die an den unterschiedlichen Endozytosemechanismen beteiligt sind, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und die Nanopartikelaufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie oder CLSM untersucht. Eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale von Nanopartikeln und Zellkompartimenten zeigt, dass sich die Nanopartikel zum Zeitpunkt der Bildaufnahme im

entsprechenden Zellkompartiment befinden. Referenz^[198] gibt einen Überblick über gängige Marker zur Visualisierung der entsprechenden Zellkompartimente. Um zu überprüfen, ob die mittels *Layer-by-Layer*-Verfahren aufgetragenen Oberflächenbeschichtungen (PEI und Chitosan) einen Einfluss auf die Zellaufnahme der Nanopartikel bzw. die Freisetzung aus den Endosomen und Lysosomen besitzen, wurden die in Abschnitt 5.1.2 bzw. in Abschnitt 5.1.5 beschriebenen, grünfluoreszierenden Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel für Zellaufnahmestudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (engl. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) verwendet. Die Lysosomen der HeLa-Zellen wurden mit einem rotfluoreszierenden Protein (engl. *red fluorescent protein*, RFP) markiert. Dazu wurden die HeLa-Zellen ca. 24 h vor den Zellaufnahmestudien mit einer plasmid-DNA transfiziert, die für das RFP-markierte, lysosomassoziierte Membranprotein 1 (engl. *red fluorescent Lysosomal-associated membrane protein 1*, Lamp1-RFP) kodiert. Dadurch wurde das rotfluoreszierende Lamp1-Protein in den lysosomalen Membranen überexprimiert, so dass die Lysosomen in der Fluoreszenzmikroskopie rot erschienen. Nach weiterer Kultivierung über Nacht wurden die grünfluoreszierenden Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel zu den Zellen hinzugegeben und die Nanopartikelaufnahme nach 1 h und 3 h unter Lebendbedingungen mittels CLSM untersucht (siehe Abbildung 28).

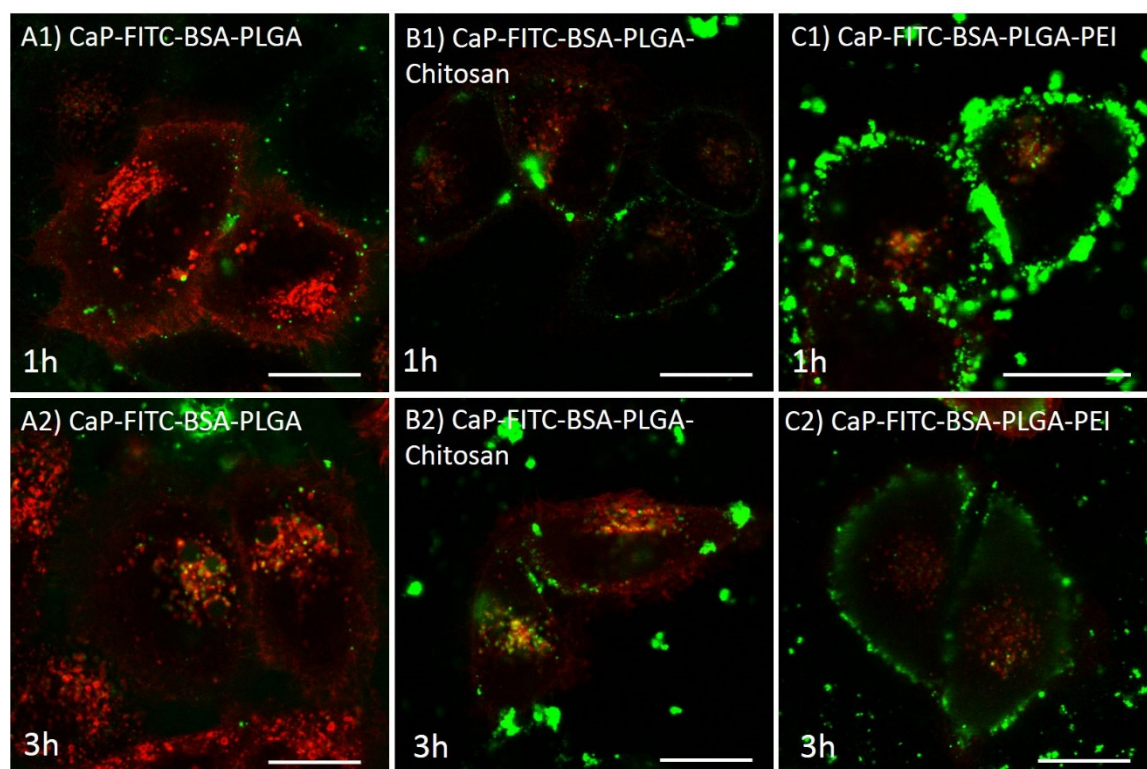


Abbildung 28: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen von Lamp1-RFP (rote Fluoreszenz) exprimierenden HeLa-Zellen, 1 h (A1-C1) und 3 h (A2-C2) nach der Inkubation mit anionischen Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikeln (A1, A2), kationischen Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Chitosan-Nanopartikeln (B1, B2), und kationischen Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-PEI-Nanopartikeln (C1, C2). Die Aufnahmen wurden unter Lebendbedingungen durchgeführt. Die Nanopartikel fluoreszieren grün. Der Maßstab entspricht jeweils 20 μm .

Die Aufnahmen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (Abbildung 28) zeigen, dass die grünfluoreszierenden Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel gut von den HeLa-Zellen aufgenommen wurden. Die anionischen unbeschichteten Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel (Abbildung 28, A1+A2) wurden von den HeLa-Zellen nur schlecht aufgenommen. In den Aufnahmen, die eine Stunde nach der Partikelzugabe angefertigt wurden (Abbildung 28, A1), ist zu erkennen, dass einige Partikel an der äußeren Zellmembran lokalisiert sind und (endozytotisch) aufgenommen werden. Nach 3 h (Abbildung 28, A2) sieht man eine deutliche Co-Lokalisation (gelbe Fluoreszenz) mit grünfluoreszierenden Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nano-

partikeln und dem rotfluoreszierenden Lamp1. Dies deutet darauf hin, dass die anionischen Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel den Endosomen und Lysosomen nur bedingt entkommen können. Die kationischen Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Chitosan-Nanopartikel (Abbildung 28, B1+B2) zeigen eine deutliche höhere Affinität zu der anionischen Zellmembran (Abbildung 28, B1) als die anionischen Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel (Abbildung 28, A1). Nach 1 h lagern sich die Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Chitosan-Nanopartikel an der Membran an und werden (endozytotisch) aufgenommen. Nach 3 h ist eine partielle Co-Lokalisation mit Lamp1-RFP (gelbe Fluoreszenz durch Überlagerung von grün und rot) zu erkennen, die jedoch deutlich geringer ausgeprägt ist als bei den anionischen Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikeln. Des Weiteren ist eine diffuse grüne Fluoreszenz im Zytosol zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Chitosan-Nanopartikel den sogenannten Protonenschwammeffekt ausgelöst haben und dadurch den Endosomen bzw. Lysosomen erfolgreich entkommen sind. Dieser Effekt ist noch deutlicher bei den kationischen Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-PEI-Nanopartikeln (Abbildung 28, C1+C2) zu erkennen. Eine Stunde nach der Nanopartikelzugabe (Abbildung 28, C1) ist eine sehr starke Affinität der positiv geladenen Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-PEI-Nanopartikel zu der anionischen Zellmembran zu erkennen. Die Nanopartikel bedecken die äußere Zellmembran fast vollständig und werden von der Zelle (endozytotisch) aufgenommen. Nach 3 h ist schließlich eine äußerst ausgeprägte diffuse grüne Fluoreszenz im Zytosol der Zelle und kaum noch Co-Lokalisation mit Lamp1-RFP zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-PEI-Nanopartikel sehr effektiv den sog. Protonenschwammeffekt auslösen und den Endosomen bzw. Lysosomen entkommen.

Dies bestätigt die literaturbekannten Ergebnisse zu Polyethylenimin-basierten Wirkstoffträgersystemen.^[66, 68, 92, 98, 111, 122, 143, 199, 200] Durch die Funktionalisierung der Oberfläche mit den polykationischen Polymeren Polyethylenimin und Chitosan konnten die anionischen, unbeschichteten Nanopartikel erfolgreich umgeladen und die endozytotische Aufnahme durch Zellen stark erhöht werden. Nanopartikel, die mit Polyethylenimin beschichtet wurden, induzieren den Protonenschwammeffekt und entkommen sehr effizient den Endosomen und Lysosomen. In diesen Aufnahmestudien wurde jedoch nicht deutlich, ob die

Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel das fluoreszenzmarkierte Modellprotein FITC-BSA unter den degradierenden Bedingungen der Endosomen und Lysosomen bereits freigesetzt haben, oder ob FITC-BSA nach der endo-/lysosomalen Freisetzung der Nanopartikel noch in den Nanopartikeln eingeschlossen ist. Ein Verbleib des Wirkstoffs in den Nanopartikeln und eine kontrollierte Freisetzung im Zytosol der Zelle sollte die Effizienz des Wirkstoffträgersystems erhöhen. Dies sollte insbesondere in Genstummschaltungsexperimenten die Effizienz der Nanopartikeln erhöhen. Im Folgenden wird daher die Effizienz der Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikel mit den unterschiedlichen Beschichtungen untersucht.

Die in diesem Abschnitt gezeigten CLSM-Aufnahmen wurden von Frau Dipl. Biol. Sarah Karczewski angefertigt.

5.1.6.2 Genstummschaltungsexperimente mit Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln

Für Genstummschaltungsexperimente wurden HeLa-eGFP Zellen verwendet, die das grünfluoreszierende Protein stabil exprimierten.^[68, 80, 131, 173] Diese Modell-Zelllinie fluoresziert wegen der kontinuierlichen eGFP-Expression grün. Werden diese grünfluoreszierenden HeLa-Zellen mit einer siRNA transfiziert, die gegen die Sequenz des eGFP-kodierenden Gens gerichtet ist (also komplementär zur eGFP-kodierenden *mRNA*), so kann diese anti-eGFP-siRNA über den Mechanismus der RNA-Interferenz die Expression des eGFP stummschalten. Infolgedessen vermindert sich auch die grüne Fluoreszenz der HeLa-eGFP Zellen, so dass die Genstummschaltungseffizienz eines Wirkstoffträgers, der mit anti-eGFP-siRNA beladen ist, mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ermittelt werden kann.^[68, 80, 131, 173, 174] Die Genstummschaltungseffizienz berechnet sich dann nach Gleichung 6.

In Gleichung 6 werden die nicht fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle (unbehandelte HeLa-eGFP-Zellen) mit den nicht fluoreszierenden Zellen nach erfolgter Transfektion mit den Nanopartikeln verglichen. Damit wird ein Maß für die Genstummschaltungseffizienz des Wirkstoffträgersystems erhalten.

In Abbildung 29 sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dargestellt.

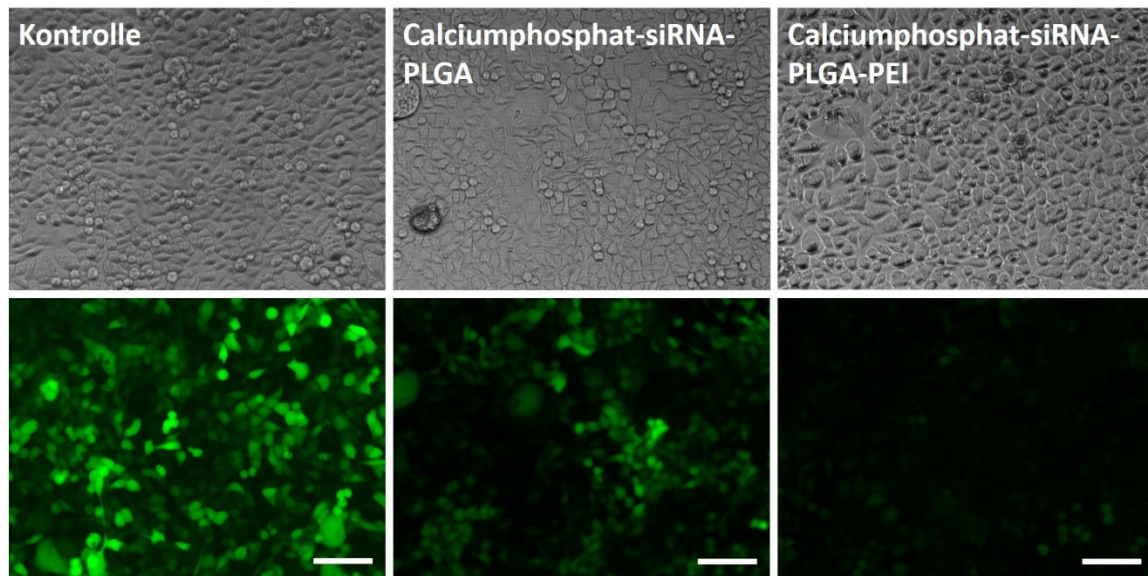


Abbildung 29: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HeLa-eGFP-Zellen 72 h nach Zugabe der Nanopartikel. (Links) unbehandelte HeLa-eGFP-Zellen als Kontrollexperiment. (Mitte) HeLa-eGFP-Zellen nach der Inkubation mit Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikeln und (rechts) nach der Inkubation mit Calciumphosphat-siRNA-PLGA-PEI-Nanopartikeln. Der Maßstab entspricht jeweils 100 μm .

In Abbildung 29 ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität der grünen Fluoreszenz nach Zugabe der Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikel im Vergleich zu unbehandelten HeLa-eGFP-Zellen stark reduziert wurde. Die mittels Gleichung 6 berechneten Genstummschaltungseffizienzen sind in Abbildung 30 dargestellt. Die anionischen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel verringerten die Expression des eGFP um 53 %, was vergleichbar mit den anionischen dreischaligen Calciumphosphat-siRNA-Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikeln nach Sokolova *et al.* ist.^[80] Durch die *Layer-by-Layer*-Beschichtung mit Chitosan und Polyethylenimin (PEI) konnte die Effizienz der Genstummschaltung auf 68 % bzw. 89 % erhöht werden. Dies steht im Einklang mit den Zellaufnahmestudien, die in Abschnitt 5.1.6.1 diskutiert wurden. Nanopartikel, die mit den polykationischen Polymeren mittels *Layer-by-Layer*-Verfahren beschichtet wurden, wurden von den HeLa-Zellen wesentlich besser aufgenommen und induzierten zudem den Protonenschwammeffekt. Dieser Effekt war besonders bei den PEI-beschichteten Nanopartikeln zu beobachten und erklärt somit auch

die hohen Genstummschaltungseffizienzen der PEI-beschichteten Nanopartikel im Vergleich zu unbeschichteten Nanopartikeln.

Auch in der Literatur wurde dieser Effekt für Chitosan und PEI häufig beschrieben.^[66, 68, 78, 92, 98, 111, 133, 143, 193, 194, 201, 202]

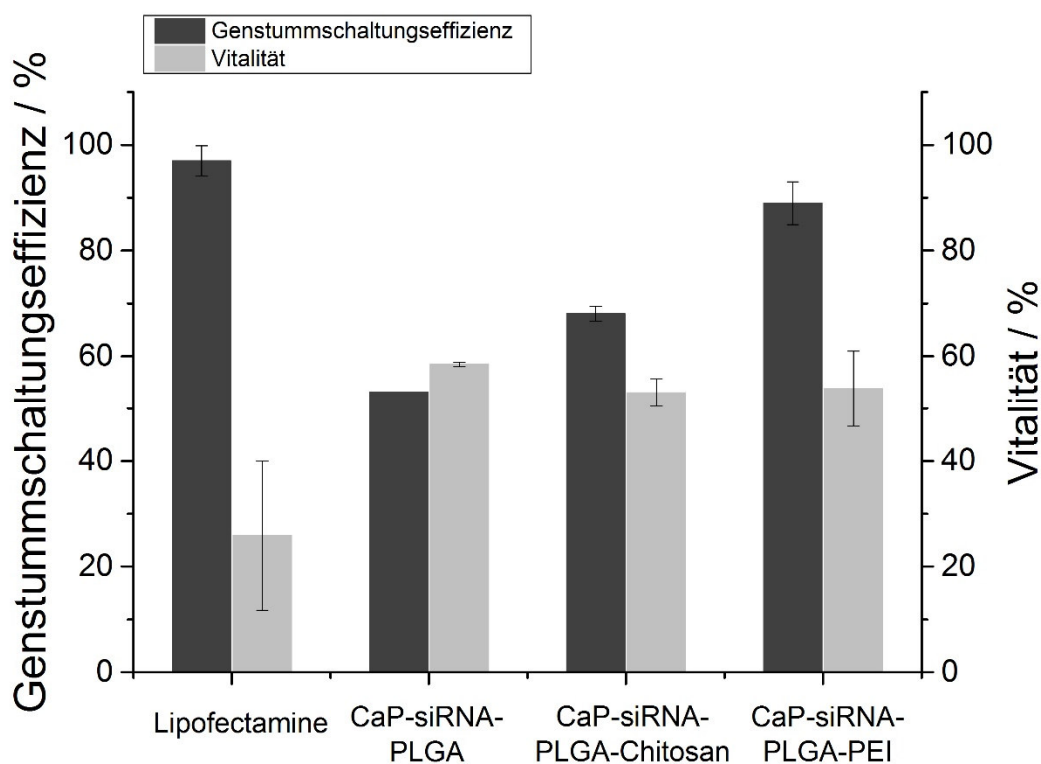


Abbildung 30: Genstummschaltungseffizienzen (dunkelgrau) und Vitalität (hellgrau) der HeLa-eGFP-Zellen nach der Behandlung mit Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikeln, Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Chitosan-Nanopartikeln und Calciumphosphat-siRNA-PLGA-PEI-Nanopartikeln im Vergleich zu Lipofectamine®.

Um die Zytotoxizität der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel zu bestimmen, wurde die Vitalität der HeLa-eGFP-Zellen 72 h nach der Inkubation mit den Nanopartikeln mittels des MTT-Tests bestimmt.

In Abbildung 30 ist neben den Genstummschaltungseffizienzen (dunkelgrau) auch die Vitalität der HeLa-eGFP-Zellen 72 h nach der Inkubation mit Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln (hellgrau), sowie der Vergleich mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsmittel Lipofectamine® abgebildet. Die Vitalität der Zellen betrug 72 h nach der Inkubation mit den anionischen

Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikeln 58 %, nach der Inkubation mit Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Chitosan-Nanopartikeln 53 % und nach der Inkubation mit Calciumphosphat-siRNA-PLGA-PEI-Nanopartikeln 54 %. Im Vergleich mit Lipofectamine® (26 % Vitalität) besitzen die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel eine geringere Zelltoxizität. Die Calciumphosphat-PLGA-PEI-Nanopartikel stellen folglich wegen der hohen Genstummschaltungseffizienz und der moderaten Zytotoxizität, die an dieser Modell-Zelllinie demonstriert werden konnte, ein vielversprechendes Trägersystem für siRNA in der Gentherapie dar.

5.1.6.3 Transfektionsexperimente mit Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln

Für Transfektionsexperimente wurden die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel mit einer Plasmid-DNA funktionalisiert, die für das grünfluoreszierende Protein kodiert (pcDNA3-eGFP). Anders als bei den Genstummschaltungsexperimenten an HeLa-eGFP-Zellen, die eGFP stabil exprimieren, beweist eine grüne Fluoreszenz nach der Inkubation mit Calciumphosphat-pcDNA3-eGFP-PLGA-Nanopartikeln nun eine erfolgreiche Transfektion. Bei erfolgreicher Transfektion von HeLa-Zellen (keine Fluoreszenz) mit pcDNA3-eGFP wird eGFP nun im Zytosol exprimiert, so dass die Zellen eine grüne Fluoreszenz zeigen. Die Transfektionseffizienz kann schließlich anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen über Gleichung 5 berechnet werden.

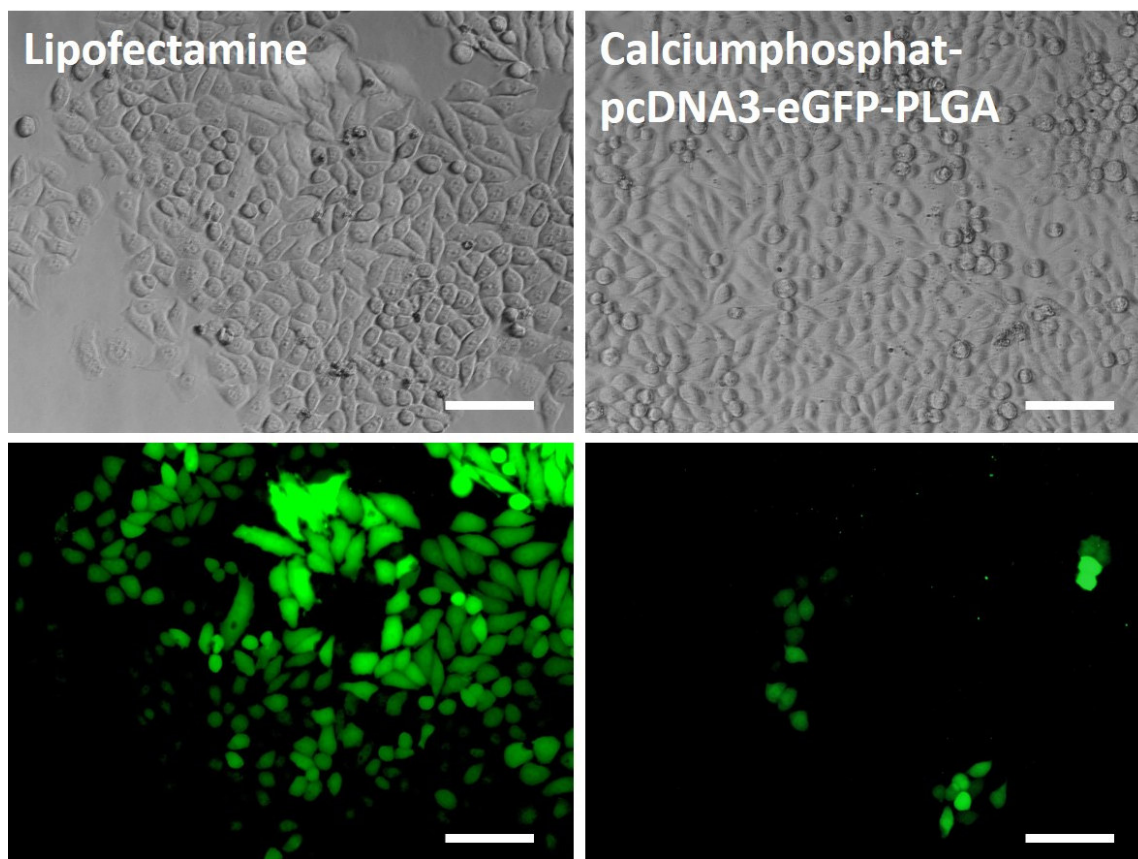


Abbildung 31: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HeLa-Zellen. (Links) HeLa-Zellen 72 h nach der Inkubation mit Lipofectamine® und (rechts) 72 h nach der Inkubation mit Calciumphosphat-pcDNA3-eGFP-PLGA-Nanopartikeln. Der Maßstab entspricht jeweils 100 µm.

In Abbildung 31 sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dargestellt. Es ist zu sehen, dass die HeLa-Zellen nach der Inkubation mit Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln, die mit pcDNA3-eGFP funktionalisiert wurden, grün fluoreszieren. Die mit Gleichung 5 berechneten Transfektionseffizienzen sind in Abbildung 32 dargestellt. Die anionischen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel induzierten die Expression von eGFP in 8 % der HeLa-Zellen, was vergleichbar mit kationischen, zweischaligen Calciumphosphat-PEI-pcDNA3-eGFP-Nanopartikeln nach Klesing *et al.* ist.^[68, 131, 132] Im Vergleich zu einschaligen, anionischen Calciumphosphat-pcDNA3-eGFP-Nanopartikeln, welche nach Sokolova *et al.* Transfektionseffizienzen von 4 % zeigten, konnte durch die Einbettung dieser Nanopartikel in eine PLGA-Matrix die Transfektionseffizienz um den Faktor 2 auf 8 % erhöht werden.^[65] Wie zuvor in den Zellaufnahmestudien und in den Genstummschaltungsexperimenten gezeigt

werden konnte, sollte die Umladung der anionischen Nanopartikel mittels *Layer-by-Layer*-Verfahren die Transfektionseffizienzen dieses Trägersystems zusätzlich verbessern.^[174]

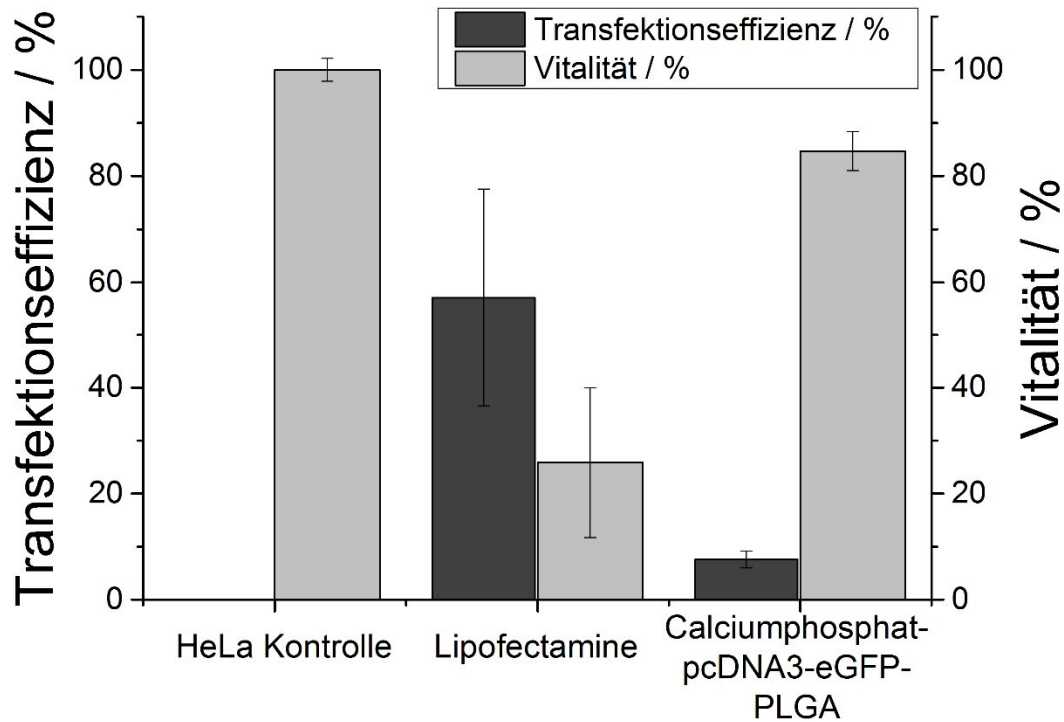


Abbildung 32: Transfektionseffizienzen (dunkelgrau) und Vitalität (hellgrau) der HeLa-Zellen nach der Behandlung mit anionischen, Calciumphosphat-pcDNA3-eGFP-PLGA-Nanopartikeln.

In Abbildung 32 ist neben den Transfektionseffizienzen (dunkelgrau) auch die Vitalität der HeLa-Zellen 72 h nach der Inkubation mit Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln (hellgrau) sowie der Vergleich Lipofectamine® abgebildet. Die Vitalität der Zellen betrug 72 h nach der Inkubation mit den anionischen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln, beladen mit pcDNA3-eGFP 85 %. Im Vergleich mit Lipofectamine® (57 % Vitalität) besitzen die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel also eine geringe Zelltoxizität.

5.1.7 Kontinuierliche Herstellung von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln

Für industrielle Anwendungen ist eine kontinuierliche Herstellung der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel erforderlich. Auf Grundlage der vielversprechenden Ergebnisse aus vorherigen Versuchen bezüglich der Größenverteilung, Verkapselungseffizienz und der biologischen Wirksamkeit im Zellkulturexperiment (siehe Abschnitte 5.1.2 - 5.1.6) wurde in dieser Arbeit eine kontinuierliche Synthese und Aufreinigungsmethode entwickelt, um Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel zu synthetisieren. Da Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel als potentielle Wirkstofftransporter biologisch unbedenklich sein und zudem unter sterilen Bedingungen hergestellt werden müssen, wurde bei der Etablierung einer kontinuierlichen Synthese das Hauptaugenmerk auf eine kontaktfreie Methode gelegt (d.h. keine der Lösungen hat einen direkten Kontakt zur Ultraschallsonotrode), um einen Titanabtrag der Sonotrode zu verhindern. Des Weiteren wurde der Aufbau so gewählt, dass unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden kann. Dafür wurde eine Durchflussszelle (Dmini) der Firma Hielscher nach dem Aufbau von Freitas *et al.* verwendet (siehe Abbildung 33).^[203, 204]

Nach einigen Vorversuchen wurden schließlich optimale Prozessbedingungen gefunden. Da die Ultraschallwellen von der Sonotrode auf die Kühl- bzw. Übertragungsflüssigkeit transportiert werden, ist es essentiell, dass die Kühlflüssigkeit unter Druck steht (mindestens 5 bar). Ansonsten entsteht laut Herstellerangaben die Kavitation hauptsächlich am äußeren Rand des Glasrohres, welches von der Kühl- bzw. Übertragungsflüssigkeit umgeben ist und als Transportraum innerhalb der Durchflussszelle dient. Dadurch würde die Kavitation die Reaktionslösung nicht erreichen. Dies wurde mit einem Barometer und einem entsprechenden Druckminderer, der auf 5 bar eingestellt wurde, überprüft und realisiert (siehe Abbildung 35). Bei geringeren Drücken (2 Bar) war der Krafteintrag durch die Sonotrode nicht ausreichend, um die grobdisperse Wasser-in-Öl-Emulsion zu emulgieren, da am Ausgang der Durchflussszelle eine Phasentrennung deutlich zu erkennen war. Des Weiteren haben sich die Intensität der Amplitude und die Verweilzeit der Emulsion im Glasrohr der Durchflussszelle als wichtige Parameter erwiesen. Als optimale Prozessbedingung hat sich hierbei eine Verweilzeit im Glasrohr von 23 s bei einer Amplitude von 100 % herausgestellt.

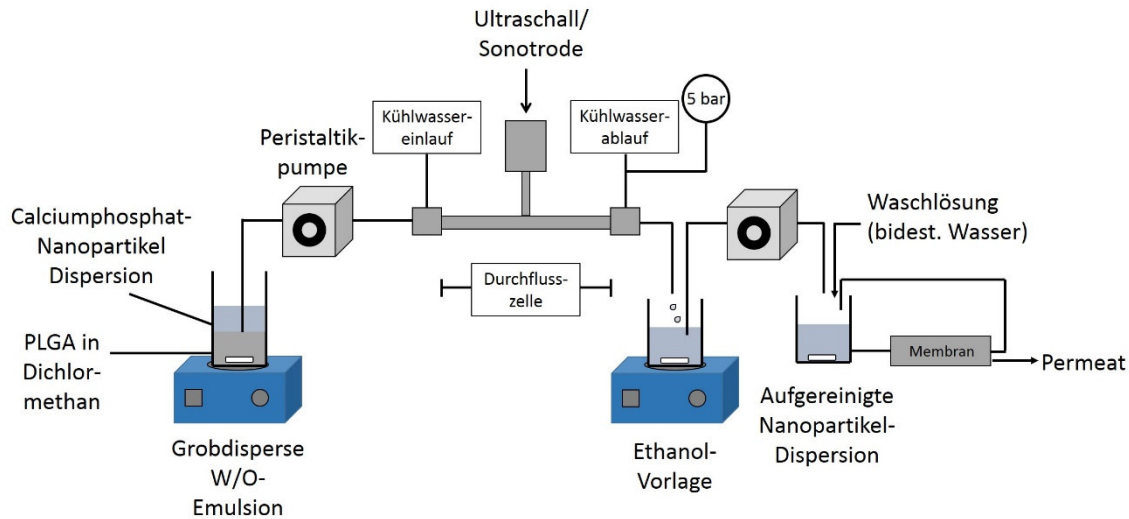


Abbildung 33: Schematische Darstellung der kontaktfreien Dmini-Ultraschall Durchflusszelle zur kontinuierlichen Fällung von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln.

Abweichend von der bisherigen Synthese und abweichend zu Freitas *et al.* wurde für die kontinuierliche Synthese der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel anstelle der Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechnik eine Wasser-in-Öl-Emulsionstechnik, gekoppelt mit einer Lösungsmittelverdrängungsmethode (engl.: *solvent diffusion*) angewendet. Im ersten Syntheseschritt wurden zunächst Calciumphosphat-DNA-Nanopartikel gemäß Abschnitt 5.1.3.1 synthetisiert. Anschließend wurde diese Dispersion zusammen mit PLGA, das zuvor in Dichlormethan gelöst wurde, in ein Becherglas gegeben und zunächst durch kräftiges Rühren grob emulgiert. Die daraus resultierende grobdisperse Wasser-in-Öl-Emulsion wurde anschließend über eine Peristaltikpumpe in die Ultraschallzelle überführt, mittels Ultraschall kontaktfrei homogenisiert und die Nanopartikel schließlich mittels der Lösungsmittelverdrängungsmethode in Ethanol ausgefällt. Die Aufreinigung der Nanopartikel erfolgte anschließend mittels tangentialer Flussfiltration (engl. *Tangential flow filtration*; TFF).

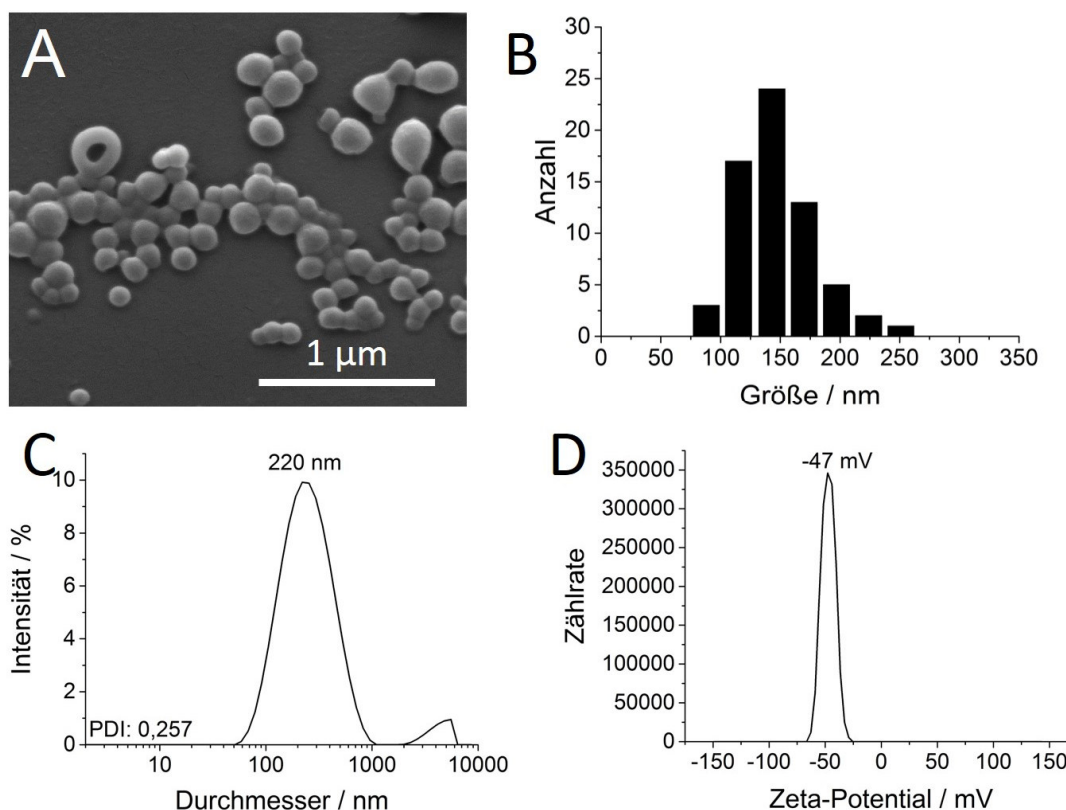


Abbildung 34: (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme und (B) Größenverteilung der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel. (C) Messkurve der Größenverteilung der dynamischen Lichtstreuung und (D) Zeta-Potential-Verlauf der über den kontinuierlichen Prozess hergestellten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel.

Die gefriergetrockneten Calciumphosphat-DNA-PLGA-Nanopartikel ließen sich durch die Zugabe von Wasser und kräftigem Pipettieren ohne den Zusatz von Kryoprotektoren gut redispergieren und verhielten sich dabei vergleichbar mit den diskontinuierlich hergestellten Nanopartikeln. Auch hier war der Einsatz des Ultraschalldispersers nicht notwendig. Zur Bestimmung der Partikelmorphologie wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 34A) angefertigt. Diese Aufnahmen zeigen leicht deformierte, kugelförmige Nanopartikel im Größenbereich von ca. 150 nm. Die Messkurve der Größenverteilung der dynamischen Lichtstreuung (Abbildung 34C) der redispergierten Nanopartikel zeigt ein monodisperses System mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 220 nm und einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,257. Zur Bestimmung der Oberflächenladung wurde das Zeta-Potential gemessen (Abbildung 34D). Durch

die endständigen Carboxylgruppen des Polymers besitzen die Calciumphosphat-DNA-PLGA-Nanopartikel mit einem Zeta-Potential von -47 mV eine negative Partikeloberflächenladung. Im Vergleich mit diskontinuierlich hergestellten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln fällt auf, dass zum einen die Partikelmorphologie nicht perfekt kugelförmig ist und zum anderen das Zeta-Potential deutlich negativer ist (-47 mV gegenüber -24 mV). Dies lässt sich beides auf die Abwesenheit von PVA als Emulsionsstabilisator zurückführen, da PVA im diskontinuierlichen Prozess zum einen die sekundäre Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion stabilisiert und zum anderen PVA teilweise, auch nach mehrfacher Zentrifugation, die Oberfläche der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel bedeckt und als nicht-ionisches Tensid somit das Zeta-Potential beeinflusst. Im kontinuierlichen Prozess kann durch die Methode der Lösungsmittelverdrängung auf PVA als Emulsionsstabilisator hingegen verzichtet werden. Unter diesen Prozessbedingungen, d.h. bei einer Fließgeschwindigkeit von $3,33 \text{ ml min}^{-1}$, ist es möglich 50 mg min^{-1} Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel auszufällen. Die Zeit für die Aufreinigung ist hierbei nicht berücksichtigt. In Abbildung 35 ist der Aufbau für die kontinuierliche Synthese im Laborbetrieb gezeigt.

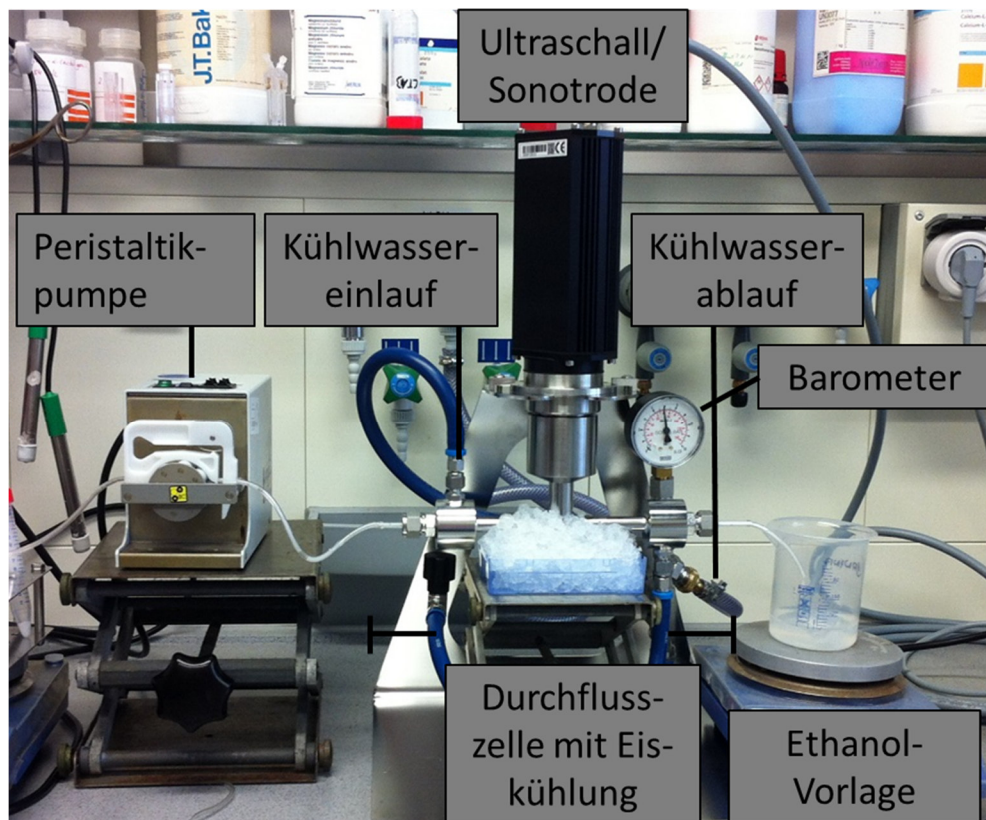


Abbildung 35: Foto der Durchflusszelle im Laborbetrieb.

5.1.8 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit konnte die Synthese von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln, funktionalisiert mit FITC-BSA als Modellprotein, über eine modifizierte Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechnik nach *Tang et al.* realisiert werden. Da FITC-BSA an Calciumphosphat-Nanopartikel adsorbiert, diese aber kolloidal nicht stabilisiert, musste die Calciumphosphat-Fällung *in situ*, d.h. in der wässrigen Phase der primären Wasser-in-Öl-Emulsion erfolgen. Dabei dienten die Wassertröpfchen als Mikroreaktoren mit definiertem Volumen und verhinderten so die Bildung von Agglomeraten. Der hydrodynamische Durchmesser der resultierenden Nanopartikel wurde mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt und betrug 190 nm mit einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,248. Das Zeta-Potential der Nanopartikel betrug durch die endständigen Carboxylgruppen des Polymers -26 mV. Der Kerndurchmesser der Nanopartikel wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmt und betrug 105 nm. Um die Zellaufnahme zu verbessern, wurde zudem die Oberfläche der Nanopartikel mit polykationischen Polymeren (Chitosan und Polyethylenimin) mittels *Layer-by-Layer*-Verfahren beschichtet. In Zellaufnahmestudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte schließlich gezeigt werden, dass die Beschichtung mit den polykationischen Polymeren die Affinität der Nanopartikel zur Zellmembran stark erhöhte und insbesondere die mit Polyethylenimin beschichteten Nanopartikel dazu in der Lage waren, den Endosomen bzw. Lysosomen effektiv zu entkommen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden anschließend Nukleinsäure-beladene Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel synthetisiert. Für Genstummschaltungsexperimente wurden die Nanopartikel mit anti-eGFP-siRNA und für Transfektionsexperimente mit pcDNA3-eGFP beladen. Der hydrodynamische Durchmesser dieser Nanopartikel betrug 195 nm mit einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,276, während der Kerndurchmesser mittels Rasterelektronenmikroskopie zu 96 nm bestimmt wurde. Auch hier erfolgte anschließend eine Umladung mit Chitosan und Polyethylenimin. Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel, die mit pcDNA3-eGFP beladen wurden, zeigten gute Transfektionseffizienzen. In Genstummschaltungsexperimenten an HeLa-Zellen, die das grün fluoreszierende Protein exprimieren, zeigten die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel beladen mit anti-eGFP-siRNA Genstummschaltungseffizienzen von

53% für anionische Nanopartikel, 68% für Chitosan-beschichtete Nanopartikel und 89% für Polyethylenimin-beschichtete Nanopartikel. Neben der biologischen Wirksamkeit im Zellkulturexperiment konnte zudem gezeigt werden, dass die Verkapselungseffizienzen für anionische, hydrophile Wirkstoffe wie Nukleinsäuren und Proteine durch den Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln während des Emulsionsprozesses um den Faktor drei bis zehn gegenüber reinen PLGA-Nanopartikeln gesteigert werden konnten. Dies entspricht einer Beladung von 8 µg siRNA bzw. 5 µg DNA und 280 µg FITC-BSA pro Milligramm PLGA-Nanopartikel.

Abschließend wurde ein kontinuierlicher Synthese- und Aufreinigungsprozess für die Herstellung von Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln entwickelt. Dafür wurde eine Durchflusszelle der Firma Hielscher nach dem Aufbau von Freitas *et al.* verwendet und die Nanopartikel über eine gekoppelte Wasser-in-Öl-Emulsion/Lösemittelverdrängungsmethode synthetisiert und im Anschluss mittels tangentialer Flussfiltration aufgereinigt. Dadurch konnten die Nanopartikel kontaktfrei und unter sterilen Prozessbedingungen hergestellt werden. Der Kerndurchmesser der resultierenden Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel betrug 150 nm, während der hydrodynamische Durchmesser 220 nm betrug.

Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel stellen also ein vielversprechendes Trägersystem für hydrophile, anionische Wirkstoffe wie z.B. Nukleinsäuren für die Gentherapie dar. Neben ihrer guten Biokompatibilität besitzen sie hohe Verkapselungseffizienzen für Nukleinsäuren und Proteine und transportieren diese Wirkstoffe effektiv über die Zellmembran in das Zellinnere. Die Herstellung über einen kontinuierlichen Prozess erlaubt zudem die Synthese im industriellen Maßstab.

5.2 Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel als Wirkstoff-träger für hydrophobe und hydrophile Modellwirkstoffe

5.2.1 Einführung in die Thematik

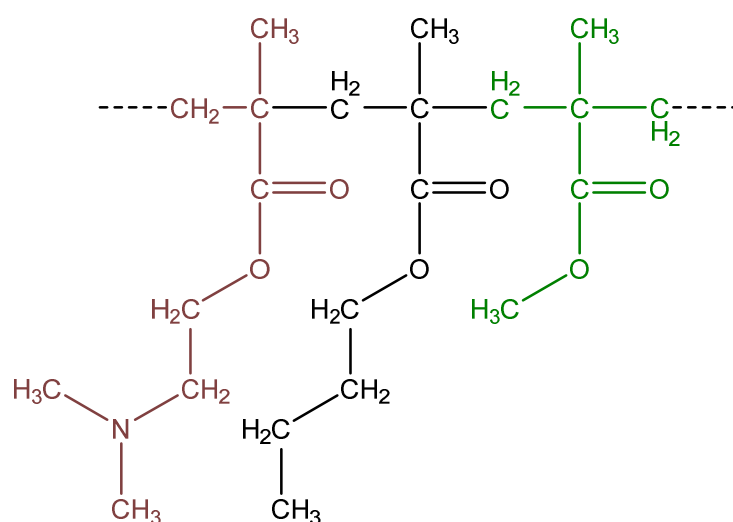
Wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben wurde, ist der Einsatz von DNA und siRNA für die Gentherapie und auch für die Vakzinierung von andauerndem Interesse in der biomedizinischen Forschung.^[103, 104, 205-207] Die Verabreichung von hydrophilen, negativ geladenen Biomolekülen mit einer hohen Ladungsdichte, wie Nukleinsäuren sie aufweisen, stellt die Wissenschaft jedoch immer noch vor eine Herausforderung.

Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Ladung und des hydrophilen Charakters alleine nicht in der Lage, die hydrophobe Lipiddoppelschicht der Zellmembran zu überqueren und werden zudem ohne zusätzlichen Schutz von Nukleasen sehr schnell abgebaut.^[102, 208, 209] Daher werden Trägersysteme benötigt, die zum einen eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren besitzen und diese effizient verkapseln und zum anderen eine möglichst hohe Biokompatibilität aufweisen und aufgrund ihrer Größe von Zellen aufgenommen werden. Nach dem Zelleintritt, der aufgrund der Größe des Trägersystems zumeist über Endozytose erfolgt, müssen die Trägersysteme anschließend noch den Endosomen und Lysosomen entkommen und die Nukleinsäuren im Zellinneren freisetzen.

Derzeit werden in der nicht-viralen Gentherapie typischerweise Trägersysteme wie Liposomen (z.B. 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan, DOTAP), Polyplexe aus polykationischen Polymeren wie Polyethylenimin (PEI) und Nanopartikel verwendet, um die Nukleinsäuren über die Zellmembran in das Zellinnere zu transportieren.^[62, 105, 194] Liposome und Polyplexe zeigen dabei oft hohe Transfektionseffizienzen, aber zugleich auch eine hohe Zytotoxizität.^[210]

Calciumphosphate sind hingegen als anorganischer Bestandteil des menschlichen Hartgewebes wie den Knochen und Zähnen sehr gut biokompatibel und besitzen eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren.^[131, 211-213] In ihrer nanopartikulären Form werden Calciumphosphate zudem von Zellen endozytotisch aufgenommen und in den Lysosomen bei pH-Werten kleiner als 5 aufgelöst.^[57, 67, 214] In Abschnitt 5.1.1 wurde bereits beschrieben, dass Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit Nukleinsäuren beladen sind, eine negativ geladene Partikeloberfläche besitzen und dadurch eine elektrostatische

Abstoßung von der ebenfalls negativ geladenen Zellmembran erfahren. Des Weiteren befinden sich die Nukleinsäuren bei diesen einschaligen Calciumphosphat-Nukleinsäure-Nanopartikeln ungeschützt auf der Oberfläche und können daher leicht von Nukleasen degradiert werden. Die Transfektions-effizienz dieser einschaligen Systeme ist typischerweise gering.^[66, 80]



Eudragit E100

Poly(butylmethacrylat-co-(2-dimethylaminoethyl)methacrylat-co-methylmethacrylat) 1:2:1

Abbildung 36: Strukturformel von Eudragit®-E100 mit den Comonomeren Dimethylaminoethylmethacrylat (rot), Butylmethacrylat (schwarz) und Methylmethacrylat (grün).

Das von der FDA sowie der EMA zugelassene Pharmapolymer Eudragit®-E100 ist ein Copolymer aus Butylmethacrylat, 2-*N,N*-Dimethylaminoethylmethacrylat und Methylmethacrylat im Monomerverhältnis von 1:2:1 (siehe Abbildung 36). Es ist unlöslich im neutralen und basischen pH-Bereich, jedoch im Säuren bei pH-Werten kleiner als fünf sehr gut löslich in wässrigen Medien. Daher wird es heutzutage in der Galenik überwiegend als geschmacksmaskierendes Polymer in Tablettenüberzügen für bittere Wirkstoffe und für die Verkapselung hydrophober Wirkstoffe zur Freisetzung im Magen (*Immediate Release Polymer*) eingesetzt.^[215-217] Neben den geläufigen Einsatzgebieten in der Galenik bietet es

jedoch hervorragende chemische Eigenschaften, um als nanopartikulärer Wirkstoffträger zur Transfektion von Zellen eingesetzt zu werden. Bedingt durch die 2-*N,N*-Dimethylaminoethylmethacrylat-Einheit ist es säurelöslich (bis pH = 5) und zudem kationisch, so dass es an die negativ geladene Zellmembran binden und in nanopartikulärer Form endozytotisch in das Zellinnere aufgenommen werden kann. Da sich Nanopartikel nach der endozytotischen Aufnahme üblicherweise in den Endosomen bzw. Lysosomen befinden und dort ein saurer pH-Wert herrscht (pH 4 bis 5), sollte sich das Polymer unter diesen Bedingungen lösen und die 2-*N,N*-Dimethylaminoethylmethacrylat-Einheit zudem den Protonenschwammeffekt auslösen. Dadurch können die Nanopartikel den Endosomen entkommen und den Wirkstoff im Zytosol freigeben.^[8, 83, 184, 187, 198, 218] In der Literatur wurden bereits einige Wirkstoffträgersysteme auf der Basis von kationischen Poly(2-*N,N*-dimethylaminoethylmethacrylat) Polymeren (PDMAEMA) mit hohen *in vivo* Transfektionseffizienzen und moderater Toxizität beschrieben. Hierbei wurde herausgefunden, dass zwei Eigenschaften der PDMAEMA-Polymere für die hohen Transfektionseffizienzen verantwortlich sind: ^[193, 219-222]

Erstens destabilisiert PDMAEMA die endsomalen Membranen und induziert den Protonenschwammeffekt, und zweitens dissoziieren PDMAEMA und Nukleinsäuren schnell, sobald sie im Zytosol freigesetzt wurden.

Ein weiteres Problem in der modernen Galenik ist die Verabreichung von hydrophoben Wirkstoffen wie z.B. Photosensibilisatoren für die photodynamische Therapie und anderen Wirkstoffen, welche nach dem *biopharmaceutical classification system* (BCS) nach Amidon *et al.* zur Klasse II und IV gehören, da die Bioverfügbarkeit dieser Wirkstoffe wegen ihrer schlechten Löslichkeit in den Körperflüssigkeiten üblicherweise sehr gering ist.^[209]

Das Ziel in diesem Teil der Arbeit war es daher, ein vielfältig einsetzbares, nanopartikuläres Wirkstoffträgersystem auf der Basis von Calciumphosphat-Nanopartikeln und einer äußeren Schale des kationischen Pharmapolymers Eudragit®-E100 zu synthetisieren, welches sich sowohl als Trägersystem für hydrophile Wirkstoffe für die Gentherapie (Nukleinsäuren) als auch für hydrophobe Wirkstoffe wie z.B. Photosensibilisatoren eignet. Die äußere Eudragit®-E100-Schale soll die Nukleinsäuren zudem vor enzymatischem Abbau schützen und wegen des kationischen Charakters die Zellaufnahme steigern. Bedingt durch die PDMAEMA-Einheit sollten die Calciumphosphat-Eudragit®-

E100-Nanopartikel den Protonenschwammeffekt auslösen und die üblicherweise nicht lagerfähigen einschaligen Calciumphosphat-Nukleinsäure-Nanopartikel nach Sokolova *et al.* mit einer guten Lagerstabilität ausstatten.

5.2.2 Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikel

5.2.2.1 Synthese von Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln

Die Synthese der Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel erfolgte analog zur Synthese von Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikeln (siehe Abschnitt 5.1.2). Für die Funktionalisierung mit FITC-BSA wurden zunächst zwei separierte W_1/O -Emulsionen hergestellt, in denen sich in der inneren wässrigen Phase das Phosphat-Salz (Emulsion A) bzw. das Calcium-Salz (Emulsion B) sowie FITC-BSA befand (siehe Abbildung 16). In der äußeren organischen Phase befand sich jeweils Eudragit®-E100, gelöst in Dichlormethan. Unter Ultraschallbehandlung wurden die beiden Emulsionen zu Emulsion C vereinigt, so dass Calciumphosphat-Nanopartikel in der inneren, wässrigen Phase ausfallen konnte. Hierbei wurde das Kristallwachstum durch das kleine Volumen der inneren wässrigen Phase limitiert, so dass die Wassertröpfchen als eine Art Mikroreaktor dienten, in denen die Fällung der Calciumphosphat-Nanopartikel räumlich begrenzt stattfand. Auch hier bildeten sich ohne Zusatz von FITC-BSA große Agglomerate von Calciumphosphat. Nach der Vereinigung der Emulsionen A und B zu Emulsion C wurde Emulsion C schließlich in eine kontinuierliche wässrige Phase gegeben, die zusätzlich mit 1 % Polyvinylalkohol stabilisiert wurde. Nach der Behandlung mit Ultraschall bildete sich schließlich eine stabile milchig-weiße $W_1/O/W_2$ -Emulsion analog zu Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikeln. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels fiel das Polymer nanopartikulär aus und schloss die FITC-BSA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel im Inneren der Polymermatrix mit ein. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die Nanopartikeldispersion gelb und nahezu transparent. Die mittels Zentrifugation und Redispergieren aufgereinigten Nanopartikel wurden schließlich lyophilisiert und anschließend kolloid-chemisch charakterisiert.

5.2.2.2 Kolloid-chemische Charakterisierung der Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikel

Die gefriergetrockneten Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikel ließen sich ebenso wie die Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel durch die Zugabe von Wasser und kräftigem Pipettieren ohne den Zusatz von Kryoprotektoren redispergieren. Auch der Einsatz des Ultraschalldispersers war nicht notwendig.

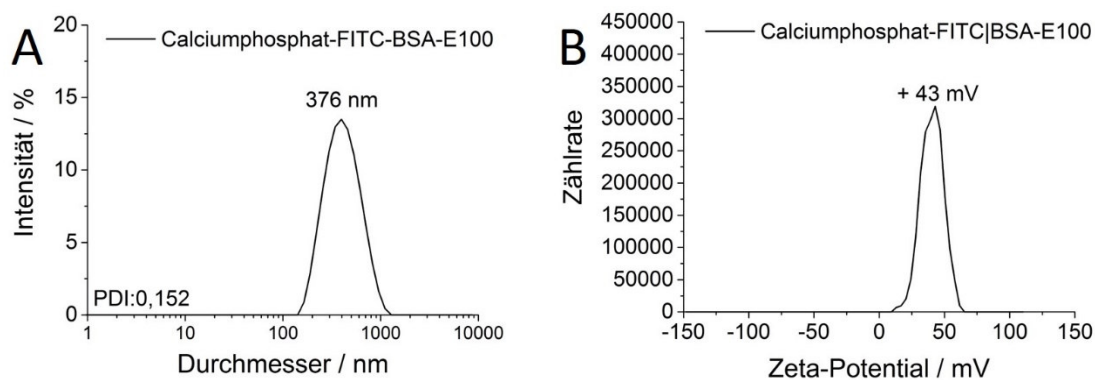


Abbildung 37: Messkurve (A) der Größenverteilung der dynamischen Lichtstreuung und (B) der Zeta-Potentialverlauf der Calciumphosphat-FITC-BSA-E100-Nanopartikel gemessen bei pH 7.

Die Messkurve der Größenverteilung der dynamischen Lichtstreuung (Abbildung 37A) der redispergierten Nanopartikel zeigt ein monodisperses System mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 376 nm und einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,152. Der hydrodynamische Durchmesser ist somit deutlich größer als der der Calciumphosphat-FITC-BSA-PLGA-Nanopartikel. Zur Bestimmung der Oberflächenladung wurde der Verlauf des Zeta-Potentials gemessen (Abbildung 37B). Bedingt durch die 2-*N,N*-Dimethylaminoethylmethacrylat-Einheiten des Polymers besitzen die Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikel mit einem Zeta-Potential von +43 mV eine stark positiv geladene Partikeloberfläche. Dies zeigt, dass die anionischen Calciumphosphat-FITC-BSA-Nanopartikel effizient in die kationische Eudragit®-E100-Matrix eingeschlossen wurden.

5.2.3 Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel

5.2.3.1 Synthese von Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikeln

Die Synthese der Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel erfolgte analog zu der Synthese von Calciumphosphat-siRNA-PLGA-Nanopartikeln (siehe Abschnitt 5.1.3. Zunächst wurden siRNA-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel über eine kontrollierte Fällungsreaktion nach Sokolova *et al.* synthetisiert. Die daraus resultierende, wässrige Nanopartikeldispersion mit Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikeln (Calciumphosphat Kern und siRNA Schale) wurde im nächsten Schritt als innere wässrige Phase (W_1) in einer $W_1/O/W_2$ -Emulsion verwendet, wobei Eudragit®-E100 in Dichlormethan gelöst war (organische Phase, O) und eine Lösung aus Polyvinylalkohol (PVA, 1 %) als kontinuierliche wässrige Phase (W_2) diente. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels fiel das Polymer (Eudragit®-E100) aus und umhüllte die Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikel mit einer zusätzlichen Polymer-Schale. Die daraus resultierenden Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel wurden anschließend mehrfach mittels Zentrifugation aufgereinigt und schließlich gefriergetrocknet.

Für die zusätzliche Funktionalisierung der Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel mit dem hydrophoben, rotfluoreszierenden Photosensibilisator (5,10,15,20-Tetrakis(4-Hydroxyphenyl)porphyrin, THPP) wurde THPP während des Emulsionsprozesses zusammen mit Eudragit®-E100 in der organischen Phase gelöst (siehe Abbildung 18). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Wirkstoff schließlich mit in der Polymermatrix eingeschlossen. Die resultierenden Nanopartikel waren tief violett und wurden mittels Zentrifugation aufgereinigt und gefriergetrocknet.

5.2.3.2 Kolloid-chemische Charakterisierung der Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikel

Auch die mit Nukleinsäure-beladenen und gefriergetrockneten Calciumphosphat-Eudragit®-Nanopartikel ließen sich ohne Zusatz von Kryoprotektoren gut redispergieren. Zudem war auch hier der Einsatz des Ultraschalldispersers nicht notwendig.

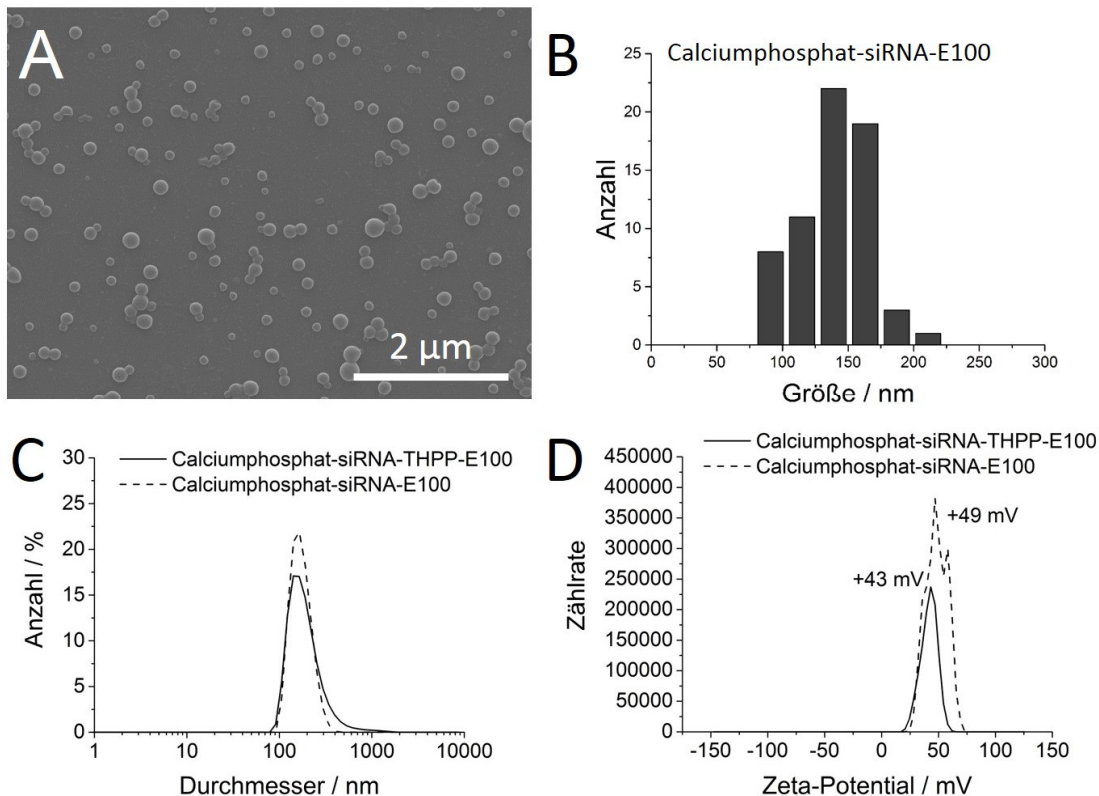


Abbildung 38: Kolloidchemische Charakterisierung der Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100- bzw. der Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikel. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel (A) und die daraus bestimmte Partikelgrößenverteilung (B), sowie die Messkurven der dynamischen Lichtstreuung zur Bestimmung der Größe (C) und des Zeta-Potentials (D) gemessen bei pH 7.

Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel (Abbildung 38A) zeigt diskrete kugelförmige Nanopartikel im Größenbereich von 130 nm. Die Messkurve der dynamischen Lichtstreuung (Abbildung 38C) der redispergierten Nanopartikel zeigt ein monodisperses System mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 198 nm

und einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,025. Zur Bestimmung der Oberflächenladung wurde der Verlauf des Zeta-Potentials gemessen (Abbildung 38D). Bedingt durch die 2-*N,N*-Dimethylaminoethylmethacrylat-Einheiten des Polymers besitzen die Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel mit einem Zeta-Potential von +49 mV eine stark positiv geladene Partikeloberfläche. Durch die Einbettung des Modellwirkstoffes für die photodynamische Therapie (THPP) konnte gezeigt werden, dass die Syntheseroute ($W_1/O/W_2$ -Emulsion) auch für die Inkorporation von hydrophoben Wirkstoffen geeignet ist. Die Größe und das Zeta-Potential der Nanopartikel änderten sich durch den Zusatz von THPP nur geringfügig (siehe Abbildung 38C, D). Durch die Einbettung von THPP ist es zudem möglich, die Nanopartikelaufnahme in Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu verfolgen, da THPP den Nanopartikeln eine rote Fluoreszenz verleiht.

Die Ergebnisse der kolloid-chemischen Analyse zeigten, dass die mittels einer kontrollierten Fällungsreaktion nach Sokolova *et al.* synthetisierten, Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel mittels $W_1/O/W_2$ -Emulsionstechniken auch in eine kationische Matrix aus Eudragit®-E100 eingebracht werden können und eine zusätzliche Funktionalisierung mit einem hydrophoben Wirkstoff möglich ist. Die resultierenden Nanopartikel besaßen alle eine gute Lagerstabilität und konnten ohne den Zusatz von Kryoprotektoren gefriergetrocknet und ohne Ultraschallbehandlung redispergiert werden.

5.2.4 Bestimmung der Verkapselungseffizienz

Für die Bestimmung der Verkapselungseffizienz der Biomoleküle (FITC-BSA und siRNA) in die Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel wurde der Überstand nach der Zentrifugation mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 460 nm (für FITC-BSA) bzw. bei 260 nm (für siRNA) untersucht. Es wurde jedoch sowohl bei der Verkapselung von FITC-BSA bei 460 nm, als auch bei der Verkapselung von siRNA bei 260 nm keine Absorption beobachtet. Daher wurden FITC-BSA und siRNA zu je 100 % in die Eudragit®-E100-Matrix eingeschlossen. Die stark kationische Eudragit®-E100-Schale besitzt folglich eine hohe Affinität zu den anionischen Biomolekülen und erhöht die Verkapselungseffizienz im Vergleich zu den anionischen PLGA-Nanopartikeln

stark. Dies entspricht einer Beladung von 125 µg FITC-BSA bzw. 10 µg siRNA pro mg Nanopartikel. Zusätzlich wurde die Anzahl an Wirkstoffmolekülen pro Nanopartikel berechnet. Dafür wurde zunächst die Anzahl an Nanopartikeln pro m³ mit Gleichung 8 berechnet. Als durchschnittlicher Radius der Calciumphosphat-E100-Nanopartikel wurde $r(NP) = 65 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ und die Dichte von Hydroxylapatit $\rho(CaP) = 3140 \text{ kg m}^{-3}$ verwendet. Für die Dichte von Eudragit®-E100 wurde näherungsweise die Dichte von PMMA $\rho(PMMA) = 1190 \text{ kg m}^{-3}$ verwendet. Anschließend wurde die Anzahl an Wirkstoffmolekülen pro Kubikmeter anhand der Werte für die Verkapselungseffizienzen und mit Gleichung 9 berechnet. Aus dem Verhältnis von Wirkstoffmolekülen pro Kubikmeter und der Anzahl von Calciumphosphat-E100-Nanopartikeln pro Kubikmeter (Gleichung 10) wurde schließlich die Anzahl an Wirkstoffmolekülen pro Nanopartikel berechnet. Daraus resultieren für Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel 1663 FITC-BSA Moleküle pro Nanopartikel. Dies liegt trotz des größeren Radius der Calciumphosphat-E100-Nanopartikel im gleichen Größenbereich wie für Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel (1880 Moleküle FITC-BSA). Für siRNA resultieren daraus 663 Moleküle siRNA pro Calciumphosphat-E100-Nanopartikel, was ebenfalls im gleichen Größenbereich wie für Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel (255 Moleküle siRNA) liegt.

Für die Bestimmung der Verkapselungseffizienz des hydrophoben Modellwirkstoffs THPP wurden die gefriergetrockneten Nanopartikel zunächst in Ethanol gelöst und anschließend die Absorption bei 419 nm (Absorptionsmaximum von THPP) mittels UV/Vis-Spektroskopie gemessen. Die Beladung von THPP wurde schließlich mit Hilfe einer Kalibriergeraden ($y = 0,22758$, $R^2 = 0,99802$) zu 181 µg THPP pro Nanopartikel bestimmt, was einer Verkapselungseffizienz von 77 % und einer Anzahl von 237726 Molekülen THPP pro Nanopartikel entspricht. Dies zeigt, dass neben hydrophilen Biomolekülen auch hydrophobe Wirkstoffe in die Polymermatrix eingeschlossen werden können und Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel ein vielfältiges Wirkstoffträgersystem darstellen.

Auch hierbei ist zu beachten, dass die Berechnung der Anzahl der Moleküle pro Nanopartikel wegen der vereinfachten Annahmen, die bei der Berechnung (Abschnitt 5.1.4) gemacht werden, fehlerbehaftet ist. Auch in diesem Kapitel wird der Fehler bei den Berechnungen daher auf ca. 30 % geschätzt.

5.2.5 Untersuchung der biologischen Effekte im Zellkulturexperiment

5.2.5.1 Zellaufnahmestudien von Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikeln

Die konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen (Abbildung 39) zeigen, dass sowohl Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikel als auch Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikel effizient von den HeLa-Zellen aufgenommen wurden.

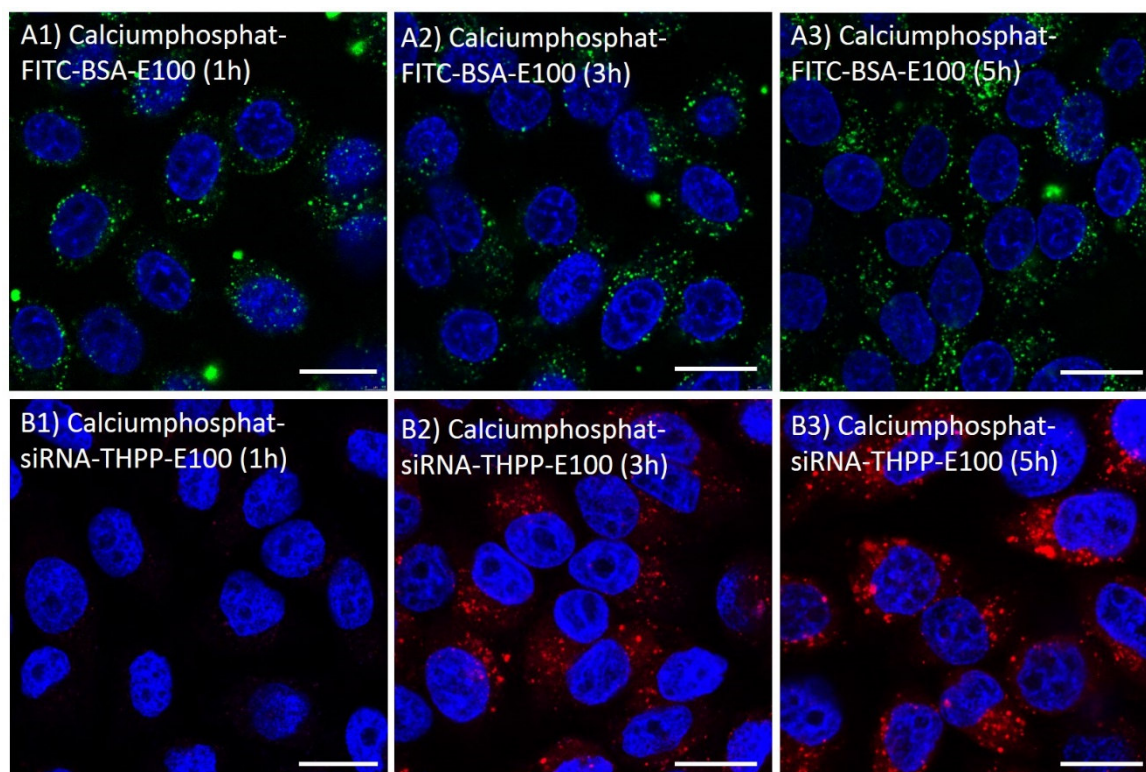


Abbildung 39: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen 1 h, 3 h und 5 h nach der Inkubation mit Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln (A1-A3) und Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikeln (B1-B3). Der Zellkern wurde blau angefärbt (DAPI). Der Maßstab entspricht jeweils 20 µm.

Die fein verteilte, diffuse Fluoreszenz im Zytosol zeigt, dass die Nanopartikel dazu in der Lage sind, den Protonenschwammeffekt auszulösen und den Endo- bzw. Lysosomen zu entkommen. Die Ergebnisse dieser Zellaufnahmestudien sind vergleichbar mit denen der kationischen Calciumphosphat-PLGA-PEI-Nanopartikeln aus Abschnitt 5.1.6.1 und zeigen eine vergleichbare Verteilung im Zytosol der HeLa-Zellen wie literaturbekannte Wirkstoffträger auf der Basis von

PDMAEMA.^[223-225] Die hier gezeigten mikroskopischen Aufnahmen mittels CLSM wurden von Frau Dr. rer. nat. Diana Kozlova angefertigt.

5.2.5.2 Bestimmung der Zytotoxizität

Um die Zytotoxizität der Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel zu bestimmen, wurde die Vitalität der HeLa Zellen 5 h nach der Inkubation mit den Nanopartikeln mit dem MTT-Test bestimmt.

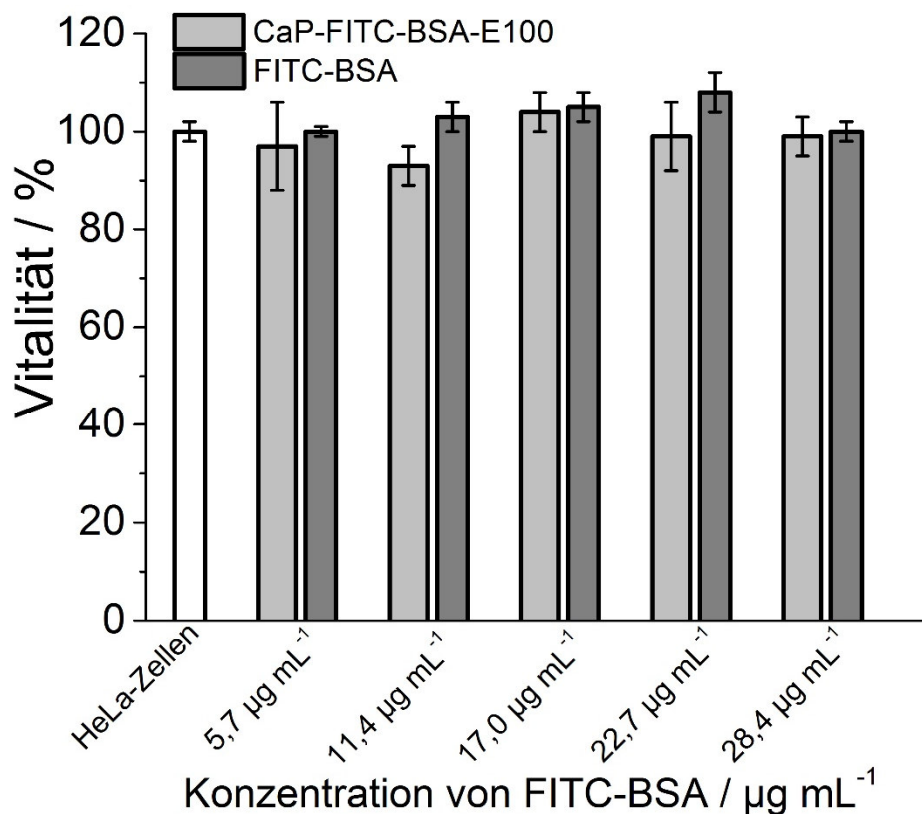


Abbildung 40: Vitalität der HeLa-Zellen 5 h nach der Inkubation mit Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln.

In Abbildung 40 ist die Vitalität der HeLa-Zellen 5 h nach der Inkubation mit Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln sowie der Vergleich mit FITC-BSA, gelöst in Wasser, gezeigt. Es ist zu erkennen, dass Calciumphosphat-FITC-BSA-Eudragit®-E100-Nanopartikel bis zu einer Konzentration von $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ FITC-BSA im Zellkulturmedium keine toxischen Effekte zeigen.

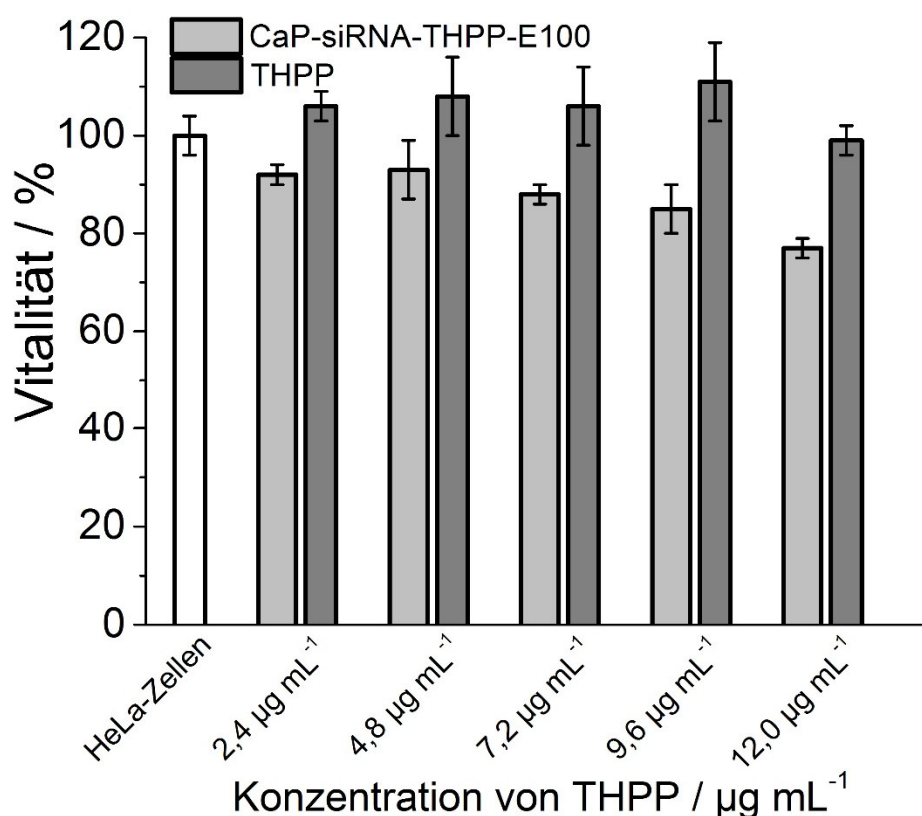


Abbildung 41: Vitalität der HeLa-Zellen 5 h nach der Inkubation mit Calcium-phosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikeln.

In Abbildung 41 sind die Vitalität der HeLa- Zellen 5 h nach der Inkubation mit Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikeln sowie der Vergleich mit THPP, gelöst in Ethanol, gezeigt. Es ist zu erkennen, dass Calciumphosphat-siRNA-THPP-Eudragit®-E100-Nanopartikel toxischer sind als THPP alleine. Da THPP in höheren Konzentrationen zytotoxische Eigenschaften besitzt, ist dieser toxische Effekt mit einer besseren Aufnahme des Wirkstoffs durch den Transport über die Nanopartikel zu erklären.^[7, 8, 63, 64]

5.2.5.3 Genstummschaltungsexperimente

Für Genstummschaltungsexperimente wurden analog zu den Genstummschaltungsexperimenten mit Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln HeLa-eGFP Zellen verwendet, die eGFP stabil exprimieren. Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und Gleichung 6 wurde schließlich die Genstummschaltungseffizienz im Verhältnis zu unbehandelten Zellen bestimmt und mit Lipofectamine® verglichen. In Gleichung 6 werden die nicht

fluoreszierenden Zellen des Kontrollexperiments (unbehandelte HeLa-eGFP-Zellen) mit den nicht fluoreszierenden Zellen nach erfolgter Transfektion verglichen. Dadurch wird ein Maß für die Genstummschaltungseffizienz des Wirkstoffträgersystems erhalten.

In Abbildung 42 sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dargestellt, die zur Bestimmung der Genstummschaltungseffizienz dienen.

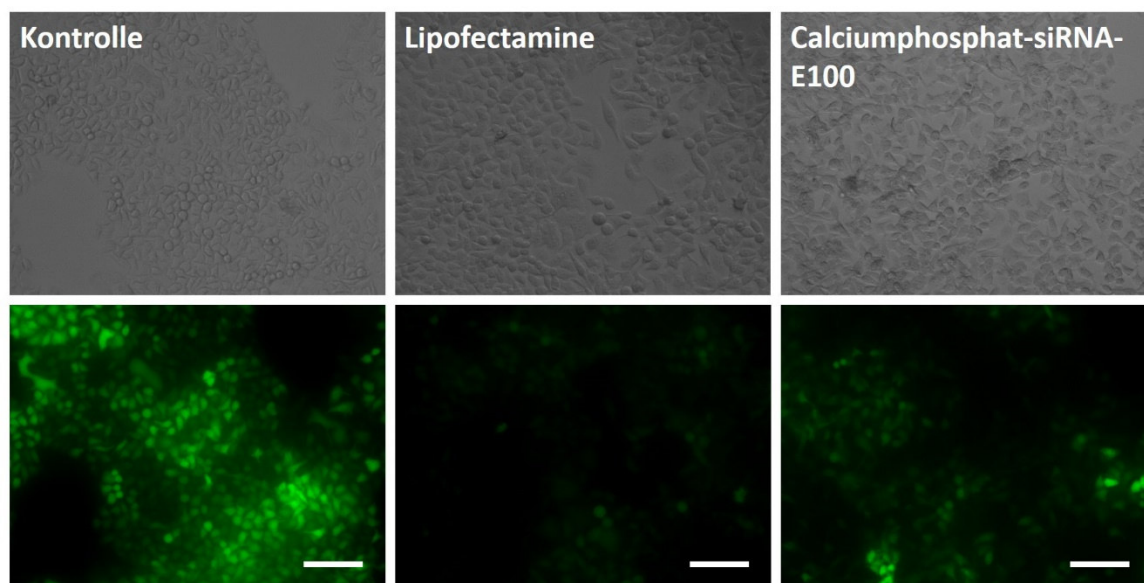


Abbildung 42: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HeLa-eGFP-Zellen. (Links) unbehandelte Zellen, (Mitte) nach Inkubation mit Lipofectamine® und (rechts) nach der Inkubation mit Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln. Der Maßstab entspricht jeweils 100 µm.

In Abbildung 42 ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität der grünen Fluoreszenz nach Zugabe der Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikel im Vergleich zu unbehandelten HeLa-eGFP-Zellen stark reduziert wurde. Die mittels Gleichung 6 berechneten Genstummschaltungseffizienzen sind in Abbildung 43 dargestellt. Die kationischen Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel verringerten die Expression des eGFP um 39 %. Dies ist vergleichbar mit kationischen PDMAEMA-basierten Polymernanopartikeln, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, und steht im Einklang mit der hohen Nanopartikelaufnahme durch HeLa-Zellen, die in Abschnitt 5.2.5.1 diskutiert wurde.^[223-226]

In Abbildung 43 ist neben den Genstummschaltungseffizienzen (dunkelgrau) auch die Vitalität der HeLa-eGFP-Zellen 72 h nach der Inkubation mit Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln (hellgrau), sowie der Vergleich mit Lipofectamine® abgebildet. Die Vitalität der Zellen betrug 72 h nach der Inkubation mit den kationischen Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln 98 %. Im Vergleich mit Lipofectamine® (84 % Vitalität) besitzen die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel eine geringere Zelltoxizität und stellen folglich wegen der hohen Genstummschaltungseffizienz und der geringen Zytotoxizität, die in dieser Modell-Zelllinie demonstriert werden konnte, ein vielversprechendes Trägersystem für siRNA in der Gentherapie dar.

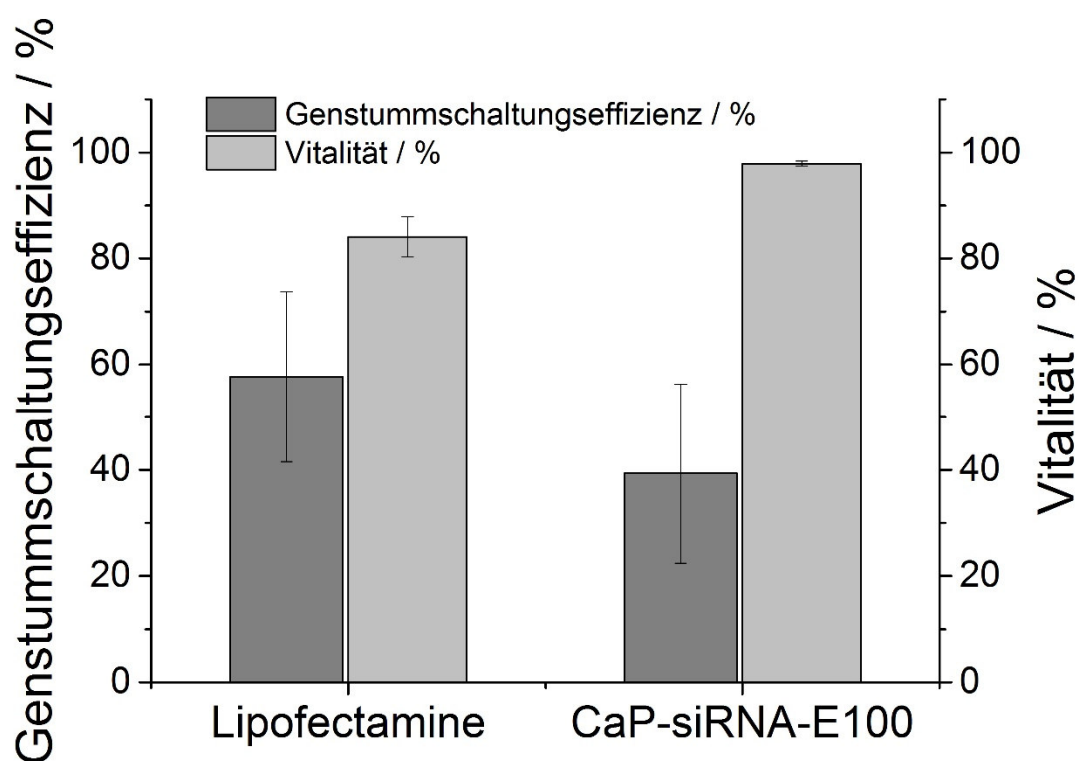


Abbildung 43: Genstummschaltungseffizienzen (dunkelgrau) und Vitalität (hellgrau) der HeLa-eGFP-Zellen nach der Behandlung mit Lipofectamine® und Calciumphosphat-siRNA-Eudragit®-E100-Nanopartikeln.

5.2.6 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel ein vielfältig einsetzbares Trägersystem darstellen. Über eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechnik konnten sowohl der hydrophobe Photosensibilisator 5,10,15,20-Tetrakis(4-Hydroxyphenyl)porphyrin als auch hydrophile, biologische Wirkstoffe wie siRNA und FITC-BSA in die Nanopartikel eingeschlossen werden. Der hydrodynamische Durchmesser der resultierenden Nanopartikel betrug 198 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,025 und einer stark positiven Oberflächenladung. Der mittels Raster-elektronenmikroskopie bestimmte Kerndurchmesser dieser Nanopartikel betrug 130 nm. In Zellaufnahmestudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte zudem gezeigt werden, dass Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel effizient von HeLa-Zellen aufgenommen wurden und nach drei Stunden den Endosomen bzw. Lysosomen entkamen. Zytotoxizitätsuntersuchungen haben die geringe Toxizität des Trägersystems bestätigt. Nach 5 h Inkubation zeigten die Nanopartikel bei HeLa-Zellen bis zu einer Konzentration von 0,1 mg mL⁻¹ keine toxischen Effekte. In Genstummschaltungsexperimenten wurde des Weiteren die biologische Wirksamkeit der Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel als Wirkstoffträgersystem für siRNA bestätigt. Die mit anti-eGFP-siRNA beladenen Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel zeigten Genstummschaltungseffizienzen von 39 %. Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel stellen also ein vielversprechendes Trägersystem sowohl für hydrophobe als auch für hydrophile anionische Wirkstoffe wie Nukleinsäuren für die Gentherapie dar. Neben ihrer guten Biokompatibilität transportieren sie diese Wirkstoffe effektiv über die Zellmembran in das Zellinnere.

5.3 Polylactid-Mikrokompositpartikel für die generative Fertigung von Knochenersatzmaterialien

5.3.1 Einführung in die Thematik

Biodegradierbare Polyester auf der Basis von Polymilchsäure (Polylactid, oder engl.: *Poly(lactic acid)*, PLA) und Polyglycolsäure (engl.: *Poly(glycolic acid)*, PGA) sowie deren Copolymere (engl.: *Poly(lactid-co-glycolic acid)*, PLGA) sind, wie bereits in Abschnitt 2.2 erläutert wurde, seit vielen Jahren als Knochenersatzmaterial in der klinischen Anwendung.^[27] Als Thermoplasten eignen sich Polylactide zudem für sogenannte *Rapid Prototyping*-Prozesse, insbesondere für das pulverbasierte selektive Lasersintern (SLS) und die Schmelzschtichtung (engl.: *Fused Deposition Modeling*, FDM). SLS findet in der regenerativen Medizin bei der Gewebekonstruktion und der Herstellung von Knochenersatzmaterialien Anwendung. Dazu werden zunächst patientenspezifische Daten z.B. mittels Computertomographie gesammelt, um die Geometrie des Knochendefekts zu bestimmen. Anhand dieser Daten wird anschließend das Knochenersatzmaterial mittels CAD-Technologie (engl. *computer aided design*) virtuell entworfen und als Schichtmodell gestaltet.^[15, 33, 227] Bei der Verarbeitung im SLS-Prozess wird das Pulver zunächst mit Hilfe von Walzen auf der Aufbauplattform gleichmäßig aufgebracht. Anschließend werden die Partikel gemäß des Schichtmodells aus den CAD-Daten in das Pulverbett gesintert (Abbildung 44). Dabei absorbieren die Partikel die Energie, die vom Laser ausgestrahlt wird und verschmelzen lokal. Durch Absenken der Aufbauplattform kann nun erneut Pulver aus dem Pulverdepot mit Hilfe der Walzen aufgebracht werden und eine neue Schicht aufgetragen werden. Die Bearbeitung erfolgt schichtweise in vertikaler Richtung, so dass sehr komplexe Strukturen erzeugt werden können. Die Auflösung wird zumeist durch die Partikelgröße bestimmt, die aus Sicherheitsgründen und wegen der Prozessierbarkeit einige Mikrometer betragen muss.^[15, 17, 228] Die Anforderungen an das zu verarbeitende Pulver sind eine für die Prozessierbarkeit angemessene Partikelgröße, geeignete Fließeigenschaften, eine ausreichende Energieabsorption der durch den Laser zugeführten Energie sowie eine Erweichungstemperatur, die durch den Laser erzeugt werden kann.^[228]

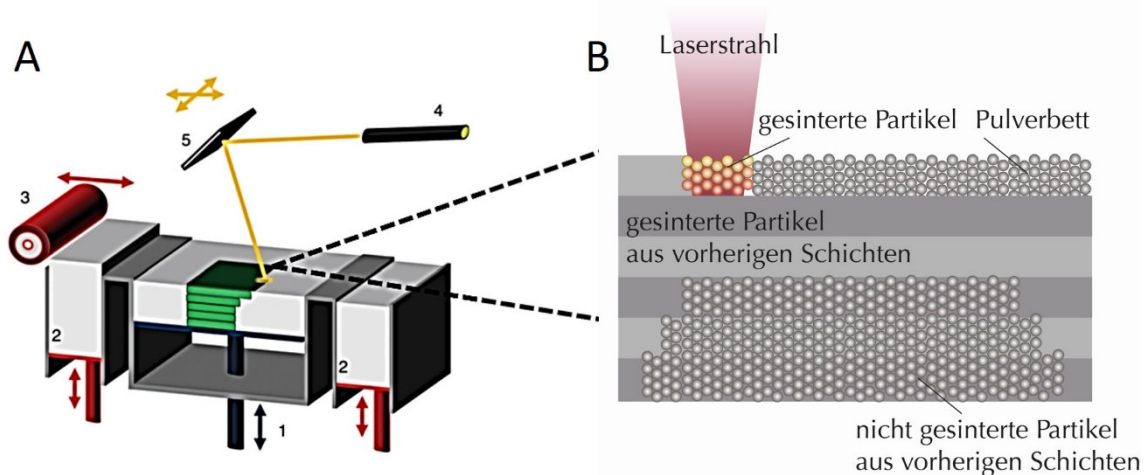


Abbildung 44: (A) Schematische Darstellung des selektiven Lasersinterns (SLS). (1) Vertikal verstellbare Aufbauplattform mit dem eingebetteten Modell (grün). (2) Pulverdepot. (3) Horizontal bewegbare Rollen für die optimale Pulververteilung. (4) CO₂-Laser und (5) optisches System für das Abrastern mit dem Laser. (B) Prinzip des Lasersinterns von Partikeln.^[15]

Neben den vielen (verarbeitungsspezifischen) Vorteilen und der Möglichkeit, mittels *Rapid-Prototyping*-Prozessen patientenspezifische Implantate zu produzieren, begrenzt eine Reihe von Nachteilen die Einsatzmöglichkeiten von Polylactiden als Knochenersatzmaterial. Wie in Abschnitt 2.2 erläutert wurde, degradieren Polylactide bei Knochenkontakt zu sauren Abbauprodukten (Milchsäure), welche zwar als Bestandteil des menschlichen Metabolismus gut verstoffwechselt werden können, aber durch die Absenkung des lokalen pH-Wertes zu Azidose und Osteolyse führen können.^[46, 229] Polylactide sind zudem aufgrund ihrer chemischen Struktur (Polyester) relativ hydrophob. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Adhäsion von Osteoblasten an der Oberfläche von Implantaten besonders von der Oberflächenrauigkeit und der Benetzbarkeit mit Wasser (Hydrophilie) des Materials abhängig ist. Osteoblasten adhären und proliferieren dabei besonders gut an rauen (nanostrukturierten) und moderat hydrophilen Oberflächen (Kontaktwinkel von 20° bis 40°) und nur sehr schlecht an glatten hydrophoben Oberflächen.^[230, 231]

Auch die mechanischen Eigenschaften von Implantaten auf der Basis von Polylactiden begrenzen die Einsatzmöglichkeiten als Knochenersatzmaterial. Im Vergleich zu Metallen (ca. 100-300 GPa) besitzen Polylactide einen geringen

E-Modul (ca. 1 GPa).^[27] Zudem können sich die mechanischen Eigenschaften im Körper, z.B. durch Quellung und Degradation, ändern und zu Materialversagen führen.^[232-234]

Um den Problemen der sauren Degradation, der schlechten Osteokonduktivität und der geringen mechanischen Stabilität entgegen zu wirken, wurden in der Literatur bereits Kompositmaterialien aus Polylactiden und anorganischen Partikeln entwickelt.^[46] Als besonders effektiv hat sich dabei die Kombination von Polylactiden als organischem Bestandteil und Calciumphosphat-Keramiken als anorganischem Bestandteil herausgestellt. Durch den Zusatz von Calciumphosphaten können die mechanischen Eigenschaften, die Benetzbarkeit und somit das Anwachsen von Osteoblasten verbessert werden.^[235-246]

Allerdings wird durch die Zugabe von Calciumphosphat-Keramiken das Problem der sauren Degradation der Polyester nicht verhindert. Linhart *et al.* untersuchten beispielsweise pH-stabilisierte PGA-Komposite (u.a. mit Carbonatapatit).^[31]

Dabei stellte sich heraus, dass Calciumphosphat alleine nicht ausreicht, um die saure Degradation des PGA zu puffern. Es zeigte sich jedoch, dass der Carbonatanteil im Carbonatapatit für die pH-Kompensation verantwortlich ist.^[24]

Dieses Prinzip der pH-Kompensation wurde in zahlreichen Veröffentlichungen untersucht und führte u.a. zu Implantaten, die aus Kompositen von Poly(*D,L*-lactid) (PDLLA), Poly(*L*-lactid) (PLLA) und Poly(*L*-lactid-co-glycolid) (PLGA) als organischem Bestandteil gefertigt wurden. Als anorganischer Bestandteil wurden Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat, Carbonatapatit, Calciumcarbonat und verschiedenen Mischungen aus diesen Bestandteilen verwendet.^{[31, 32, 45, 235, 239-}

241, 243, 244, 246-250]

In diesen Studien zeigte sich zudem, dass die mechanischen Eigenschaften der Calciumphosphat-basierten Keramiken durch die Zugabe der weniger spröden Polymere PDLLA, PLLA, und PLGA stark verbessert werden konnten, so dass ein synergetischer Effekt aus der Kombination dieser Materialien und den auf PLA und PGA basierenden Polymeren zu erwarten ist. Die Kombination von Polylactiden und Calciumphosphat bzw. Calciumcarbonat wurde erfolgreich für die Herstellung von biodegradierbaren Schädelimplantaten eingesetzt, die auch im Tierversuch *in vivo* sehr gute Ergebnisse zeigten.^[23, 30]

In diesem Kontext wurden in der vorliegenden Arbeit kugelförmige Polylactid-Mikrokompositpartikel im Größenbereich von 10-70 μm synthetisiert.

Als organischer Bestandteil der Mikrokompositpartikel wurde ein Poly(*L*-lactid-*co*-*D,L*-lactid) (PLDLLA) im Verhältnis von 67:33 (*L*-Lactid zu *D,L*-lactid) mit einer mittleren Degradationszeit von 2-3 Jahren verwendet, das unter dem Handelsnamen RESOMER® LR704S erhältlich ist. Um die Osteokonduktivität der Kompositmaterialien zu verbessern und zudem die saure Degradation der Polylactide zu verhindern, wurden Calciumphosphate und Calciumcarbonate mit verschiedenen Morphologien verwendet. Calciumphosphate wurden in Form von Hydroxylapatit-Nanopartikeln (nano-HAP) und β -Tricalciumphosphat-Mikropartikeln (mikro- β -TCP) eingesetzt. Calciumcarbonate (CC) wurden in Form von Vaterit-Mikropartikeln (mikro-Vaterit) und Calcit-Nanopartikeln (nano-Calcit) der Firma Schaefer Kalk verwendet.

Der Einfluss dieser Materialkombinationen auf die Osteokonduktivität wurde in Zellkulturexperimenten an murinen Osteoblasten (MC3T3-Zellen) untersucht. In Degradationsuntersuchungen wurde zudem geprüft, ob die saure Degradation der Polylactide durch den Zusatz der anorganischen Komponenten abgepuffert werden kann. Eine besondere Herausforderung war es, den Calciumphosphat- und Calciumcarbonat-Anteil so zu wählen, dass die mechanischen Eigenschaften des Kompositmaterials mit menschlichem Knochen vergleichbar sind. Dazu mussten die Calciumphosphat- und Calciumcarbonat-Partikel während der Synthese homogen und zu ca. 50 Gew.-% in die Polylactid-Matrix eingebaut werden. Die resultierenden Mikrokompositpartikel mussten des Weiteren ein Pulver ergeben, das für die Verarbeitung im selektiven Lasersinterprozess geeignet ist. Im Folgenden werden Synthese und Charakterisierung der Mikrokompositpartikel auf der Basis von LR704S beschrieben.

5.3.2 Synthese und Charakterisierung der verwendeten anorganischen Bestandteile

Hydroxylapatit-Nanopartikel (nano-HAP) wurden von Sigma-Aldrich bezogen und ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet. β -TCP-Mikropartikel (mikro- β -TCP) wurden von der Firma Biovision (Jena) zur Verfügung gestellt. Die Partikel wurden vor der Verwendung gemörsert und mit einem Prüfsieb (DIN 4188) ausgesiebt. Es wurden nur Partikel verwendet, die kleiner als 45 μ m waren. Calcit-Nanopartikel (nano-Calcit) wurden von der Firma Schaefer-Kalk zur

Verfügung gestellt und ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet. Die Synthese der Vaterit-Mikropartikel (mikro-Vaterit) erfolgte, wie in Abschnitt 4.3.1.1 beschrieben, über eine Fällungsreaktion von Calciumchlorid und Kaliumcarbonat, nach einer Synthesevorschrift von Sarkar *et al.*^[177]

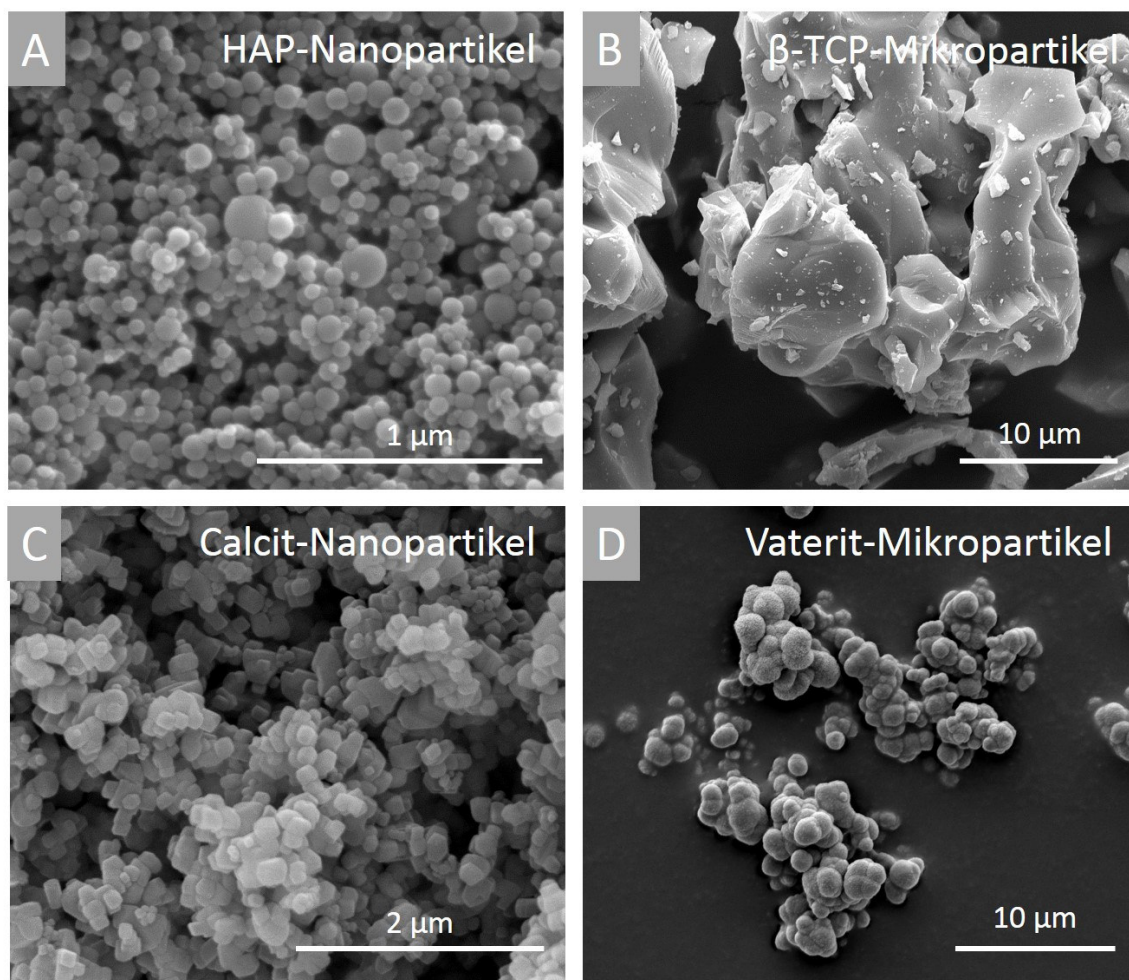


Abbildung 45: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Hydroxylapatit-Nanopartikel (A), der β -TCP-Mikropartikel (B), der Calcit-Nanopartikel (C), und der Vaterit-Mikropartikel (D).

Die REM-Aufnahmen (siehe Abbildung 45) zeigen für Hydroxylapatit-Nanopartikel der Firma Sigma-Aldrich kugelförmige Nanopartikel im Größenbereich von 30-200 nm. Die REM-Aufnahmen der gemörserten und ausgesiebten β -TCP-Mikropartikel der Firma Biovision (Abbildung 45B) zeigen Primärpartikel im Größenbereich von 5-40 μm mit einer unregelmäßigen Morphologie. An der Oberfläche dieser Primärpartikel sind kleine, splitterförmige

Partikel im Größenbereich von 0,5-2 μm adsorbiert. Die REM-Aufnahmen der Calcit-Nanopartikel der Firma Schaefer-Kalk (Abbildung 45C) zeigen Nanopartikel im Größenbereich von 60-200 nm mit einer polyedrischen Morphologie. Die laut Herstellerangaben vorliegende, definierte rhomboedrische Morphologie ist nur bei einzelnen Partikeln erkennbar. Die REM-Aufnahmen der Vaterit-Mikropartikel (Abbildung 45D) zeigen kugelförmige Partikel im Größenbereich von 1-5 μm .

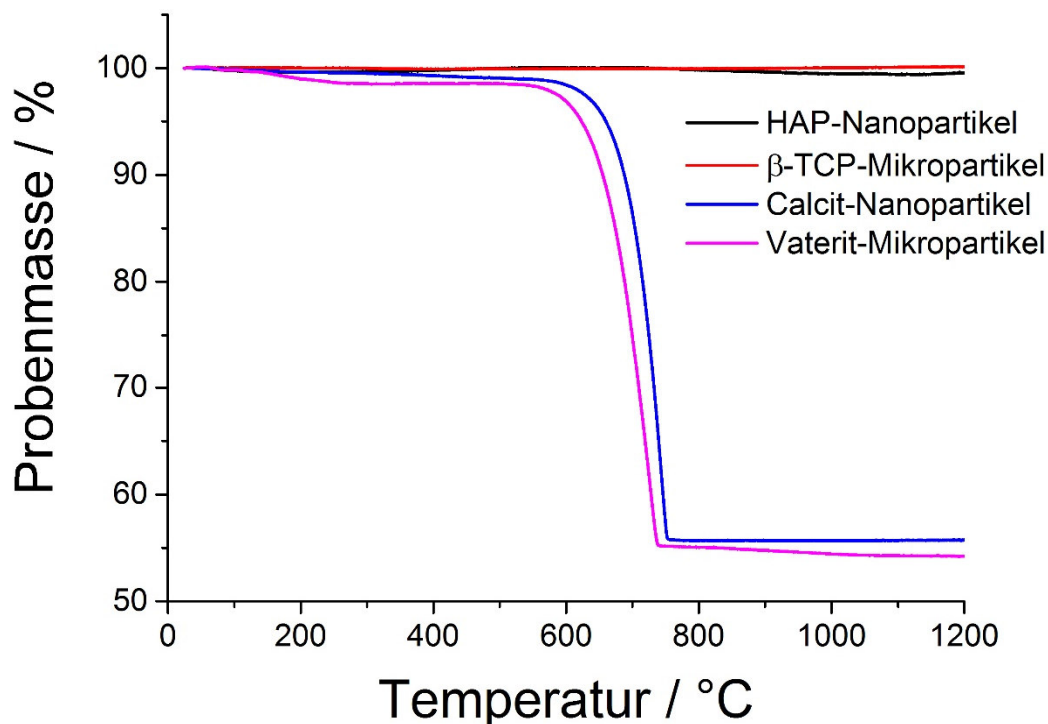


Abbildung 46: Thermogravimetrische Analyse der anorganischen Partikel, die für die Synthese der Mikrokompositpartikel verwendet wurden. Thermogramme der Hydroxylapatit-Nanopartikel der Firma Sigma-Aldrich (schwarz), der β -TCP-Mikropartikel der Firma Biovision (rot), der Calcit-Nanopartikel der Firma Schaefer-Kalk (blau) und der nach der Synthesevorschrift von Sarkar *et al.* hergestellten Vaterit-Mikropartikel (magenta).

Die thermogravimetrischen Analysen (Abbildung 46) zeigen für die verwendeten Calciumphosphate (Hydroxylapatit-Nanopartikel und β -TCP-Mikropartikel) keinen Massenverlust bis 1200 °C. Für die verwendeten Calciumcarbonate (Calcit-Nanopartikel und Vaterit-Mikropartikel) sind hingegen die charakteristischen

Massenverluste (44,4 Gew.-% und 44,9 Gew.-%) für die Zersetzung von Calciumcarbonat zu Kohlenstoffdioxid und Calciumoxid bei ca. 600 °C zu beobachten. Bei den Vaterit-Mikropartikeln beginnt die Zersetzung ca. 30 °C früher als bei den Calcit-Nanopartikeln der Firma Schaefer-Kalk.

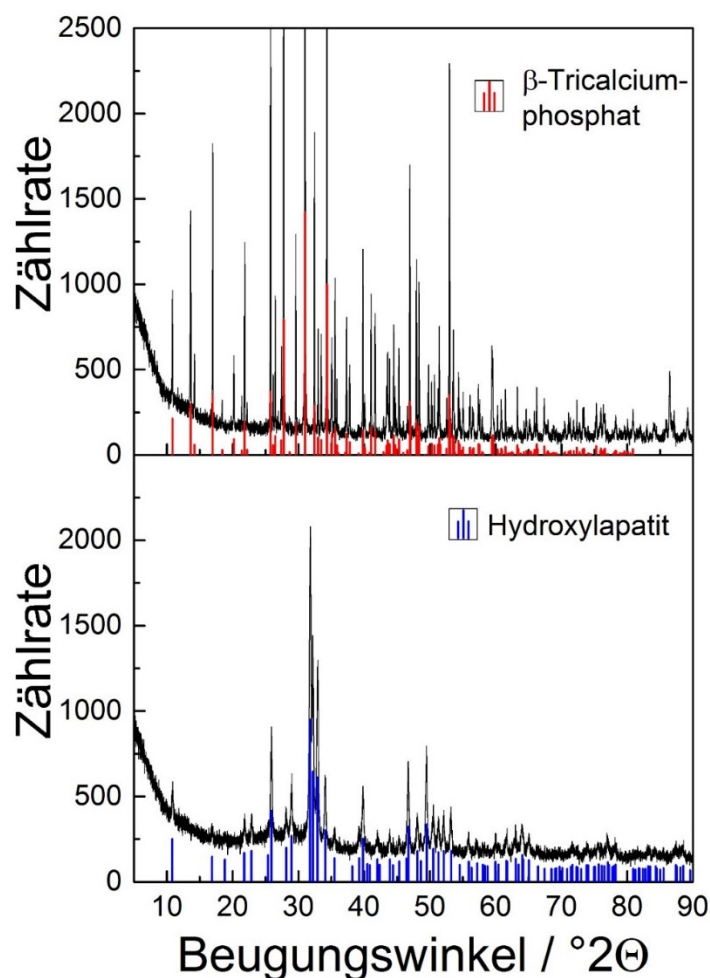


Abbildung 47: Röntgenpulverdiffraktogramme der verwendeten Calciumphosphat-Keramiken. (Oben) β -TCP-Mikro- und (unten) HAP-Nanopartikel mit den Referenzsignalen für Hydroxylapatit (blau) und β -Tricalciumphosphat (rot), entnommen aus der ICDD-Datenbank (Hydroxylapatit: 01-084-1998, β -Tricalciumphosphat: 01-070-2065).

Die Phasenreinheit der verwendeten anorganischen Bestandteile wurde mittels Röntgenpulverdiffraktometrie nachgewiesen. In Abbildung 47 und Abbildung 48 sind die Röntgenpulverdiffraktogramme der Calciumphosphate und Calciumcarbonate mit den zugehörigen Referenzsignalen abgebildet. Es ist zu erkennen,

dass die β -TCP-Mikropartikel aus phasenreinem β -Tricalciumphosphat, die Hydroxylapatit-Nanopartikel aus phasenreinem Hydroxylapatit, die Vaterit-Mikropartikel aus phasenreinem Vaterit, und die Calcit-Nanopartikel aus phasenreinem Calcit bestehen.

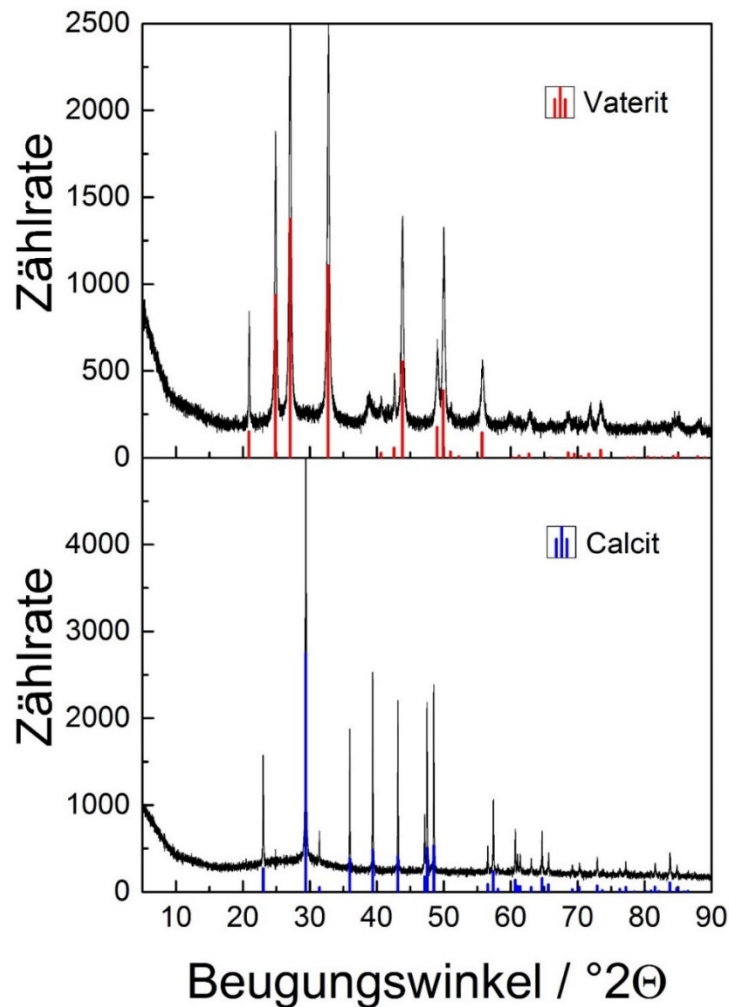


Abbildung 48: Röntgenpulverdiffraktogramm der verwendeten Calciumcarbonat-Partikel. (Oben) Vaterit-Mikro- und (unten) Calcit-Nanopartikel mit den Referenzsignalen für Calcit (blau) und Vaterit (rot), entnommen aus der ICDD-Datenbank (Vaterit: 01-072-0506, Calcit: 00-005-0586).

5.3.3 Synthese der Poly lactid-Mikrokompositpartikel mittels einer PVA-stabilisierten Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Emulsion

Die Poly lactid-Keramik-Mikrokompositpartikel wurden wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben mittels einer Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Emulsion (engl.: *solid-in-oil-in-water*, S/O/W-Emulsion) synthetisiert. Damit das Polymer besser an die Oberfläche der anorganischen Partikel adsorbieren konnte, wurden die anorganischen Partikel und das LR704S zunächst unter Rückflussskühlung für 24 h kräftig gerührt. Dabei adsorbierte das LR704S an der Oberfläche der Partikel und ermöglicht so, dass die hydrophilen Partikel besser in dem organischen Lösungsmittel (Dichlormethan) dispergiert werden konnten. Des Weiteren stieg dadurch auch die Affinität zu den hydrophoben Poly lactiden. Erst dadurch war es möglich, hohe Anteile der hydrophilen anorganischen Partikel in der Polymer-Matrix der Mikrokompositpartikel einzuschließen.^[189]

Bei der anschließenden Emulgation in einer wässrigen Lösung aus PVA erwies es sich als vorteilhaft, die Emulgation in einem verschleißbaren *high density Polyethylene* (HDPE) Gefäß durchzuführen, und die daraus resultierende S/O/W-Emulsion erst anschließend in ein Becherglas zu überführen. Dadurch konnte vermieden werden, dass das Polymer zu Beginn der Emulgation am Rand des Becherglases ausfiel. Nach der vollständigen Verdampfung des organischen Lösungsmittels (Dichlormethan) wurden überschüssiges PVA und nicht eingeschlossene anorganische Partikel durch Sedimentieren der Mikrokompositpartikel und mehrfaches Zentrifugieren entfernt. Die resultierenden Mikrokompositpartikel wurden anschließend getrocknet und durch Mörsern zu einem feinen Pulver verarbeitet. Das Pulver wurde schließlich mittels Rasterelektronenmikroskopie hinsichtlich der Morphologie und mittels Thermogravimetrie und Röntgenpulverdiffraktometrie hinsichtlich der Zusammensetzung untersucht.

5.3.3.1 LR 704S-Mikrokompositpartikel

Wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben wurde, eignet sich das RESOMER® LR704S für den selektiven Lasersinterprozess, da es beim Sinterprozess nur einen geringen Schrumpf aufweist. Um die Auswirkungen der anorganischen Komponente auf die Partikelgrößenverteilung und die Partikelmorphologie zu untersuchen, wurden zunächst die Calciumphosphate (nano-HAP und mikro- β -TCP) und die Calciumcarbonate (nano-Calcit und mikro-Vaterit) in LR704S-Mikropartikel eingebracht und miteinander verglichen. Des Weiteren wurden die Mikrokompositpartikel zu Formkörpern für die mechanische Charakterisierung und zu Presslingen für Zellkulturexperimente mittels Heißpressverfahren geformt. Die Ergebnisse sind im Folgenden, beginnend bei der morphologischen Charakterisierung mittels Rasterelektronenmikroskopie, dargestellt.

5.3.3.1.1 LR704S-Calciumcarbonat-Mikropartikel (Vergleich von Calcit-Nano- und Vaterit-Mikropartikeln als anorganische Komponente)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der LR704S-Calciumcarbonat-Mikropartikel (Abbildung 49) zeigen sowohl für Calcit-Nanopartikel als auch für Vaterit-Mikropartikel als anorganischer Komponente kugelförmige Mikrokomposit-partikel.

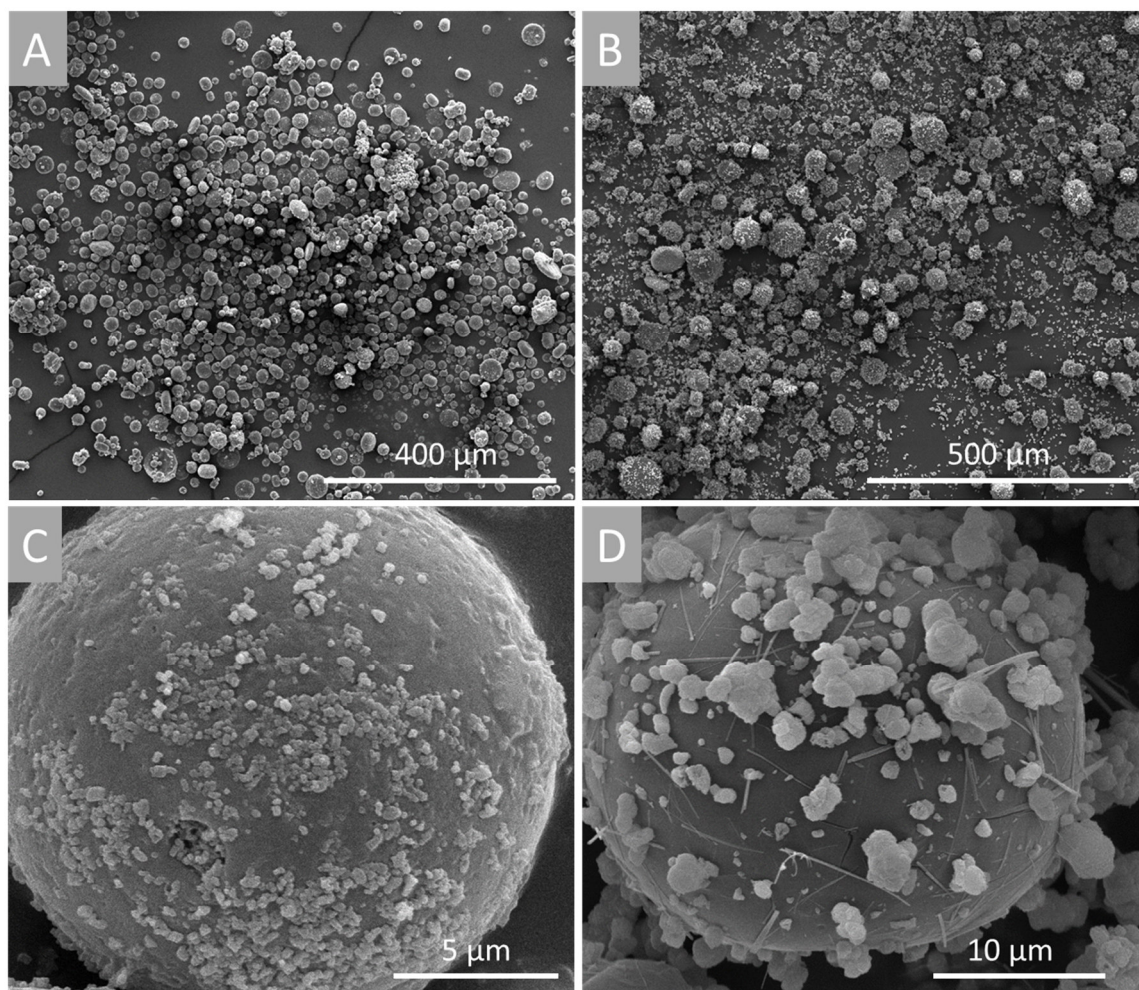


Abbildung 49: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der LR704S-nano-Calcit-Mikropartikel bei 280-facher Vergrößerung (A) und der LR704S-mikro-Vaterit-Mikropartikel bei 250-facher Vergrößerung (B). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Partikeloberfläche der LR704S-nano-Calcit-Mikropartikel bei 16000-facher Vergrößerung (C) und der LR704S-mikro-Vaterit-Mikropartikel bei 8000-facher Vergrößerung (D).

Die Partikelgrößenverteilung ist für Calcit-Nanopartikel jedoch wesentlich homogener. Die Mikrokompositpartikel liegen im Größenbereich von 10-40 μm mit einem Maximum bei 20 μm vor, während für Vaterit-Mikropartikel der Größenbereich bei 10-80 μm mit einem Maximum bei 30 μm liegt. Auch ein Vergleich der Oberflächen der Mikrokompositpartikel (Abbildung 49C und D) zeigt Unterschiede zwischen Calcit-Nanopartikeln und Vaterit-Mikropartikeln. Vaterit-Mikropartikel haben eine geringe Affinität zu der Oberfläche der Polymerpartikel und liegen dort inhomogen verteilt vor. Ebenso ist zu erkennen, dass die kugelförmigen Vaterit-Partikel teilweise in eine stäbchenförmige Morphologie umgewandelt wurden. Im Vergleich dazu zeigen Calcit-Nanopartikel eine deutlich höhere Affinität zu der Polymermatrix und liegen homogen verteilt auf der Polymerpartikeloberfläche vor.

Die Übersichtsaufnahmen (Abbildung 49A und B) zeigen, dass überschüssige Calcit-Nanopartikel, die nicht in die Polymermatrix eingeschlossen wurden, durch den Aufreinigungsprozess mittels Sedimentieren und Abdekantieren von den Mikrokompositpartikeln getrennt werden konnten. Vaterit-Mikropartikel ließen sich hingegen nicht von den Mikrokompositpartikeln trennen, da diese aufgrund ihrer Größe eine vergleichbare Sedimentationsgeschwindigkeit besitzen wie die Mikrokompositpartikel. Dies zeigt sich auch im Vergleich der thermogravimetrischen Analysen (Abbildung 50). Die überschüssigen Vaterit-Mikropartikel in den Räumen zwischen den Mikrokompositpartikeln beeinträchtigten zudem die Fließfähigkeit des resultierenden Pulvers. So zeigten die LR704S-nano-Calcit-Mikropartikel neben der homogenen Partikelverteilung eine wesentlich bessere Fließfähigkeit ($0,57 \text{ g s}^{-1}$, siehe Abbildung 58) als die LR704S-mikro-Vaterit-Mikropartikel (nicht rieselfähig). Die gute Fließfähigkeit des LR704S-nano-Calcit-Mikrokompositpulvers ermöglicht eine Prozessierbarkeit im selektiven Lasersinterprozess.

Die homogene Oberflächenbedeckung mit Calcit-Nanopartikeln sollte, wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, das Anwachsen von Osteoblasten und damit die Osteokonduktivität im Vergleich zu reinen Polymerpartikeln steigern.^[230, 231]

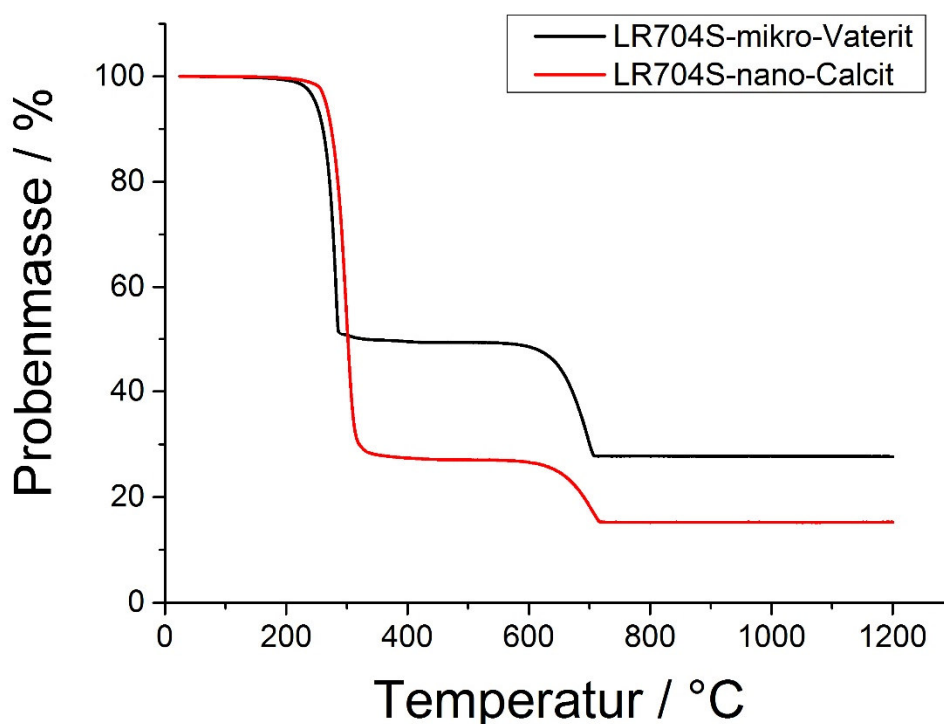


Abbildung 50: Thermogravimetrische Analyse der LR704S-Calciumcarbonat-Mikropartikel. (Schwarz) LR704S-mikro-Vaterit- und (rot) LR704S-nano-Calcit-Mikropartikel.

Mittels Thermogravimetrie wurde die Zusammensetzung der beiden LR704S-Calciumcarbonat-Mikropartikel untersucht und miteinander verglichen (Abbildung 50). Der Polymeranteil des Kompositpulvers beträgt bei Vaterit-Mikropartikeln als anorganische Komponente 50 Gew.-% und der Calciumcarbonat-Anteil 50 Gew.-%. Dies entspricht den in der Synthese eingesetzten Massenverhältnissen von LR704S zu Calciumcarbonat von 50:50 Gew.-% und zeigt, dass die Calciumcarbonat-Mikropartikel nicht von den Mikrokomposit-Partikeln abgetrennt werden konnten. Der Polymeranteil des Mikrokompositpulvers beträgt im Fall von Calcit-Nanopartikeln als anorganische Komponente 73 Gew.-% und der Calciumcarbonat-Anteil 27 Gew.-%. Diese Massenverhältnisse zeigen ebenso wie die rasterelektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahmen, dass die überschüssigen Calcit-Nanopartikel, die nicht in die Polymermatrix eingeschlossen wurden, erfolgreich von den Mikrokompositpartikeln abgetrennt werden konnten. In die Mikrokompositpartikel aus LR704S und Calcit-Nano-

partikeln können also ca. 30 Gew.-% Calciumcarbonat-Nanopartikel homogen eingebracht werden.

Mittels Röntgenpulverdiffraktometrie wurde zudem eine Phasenanalyse (Abbildung 51) der beiden LR704S-Calciumcarbonat-Mikropartikel durchgeführt.

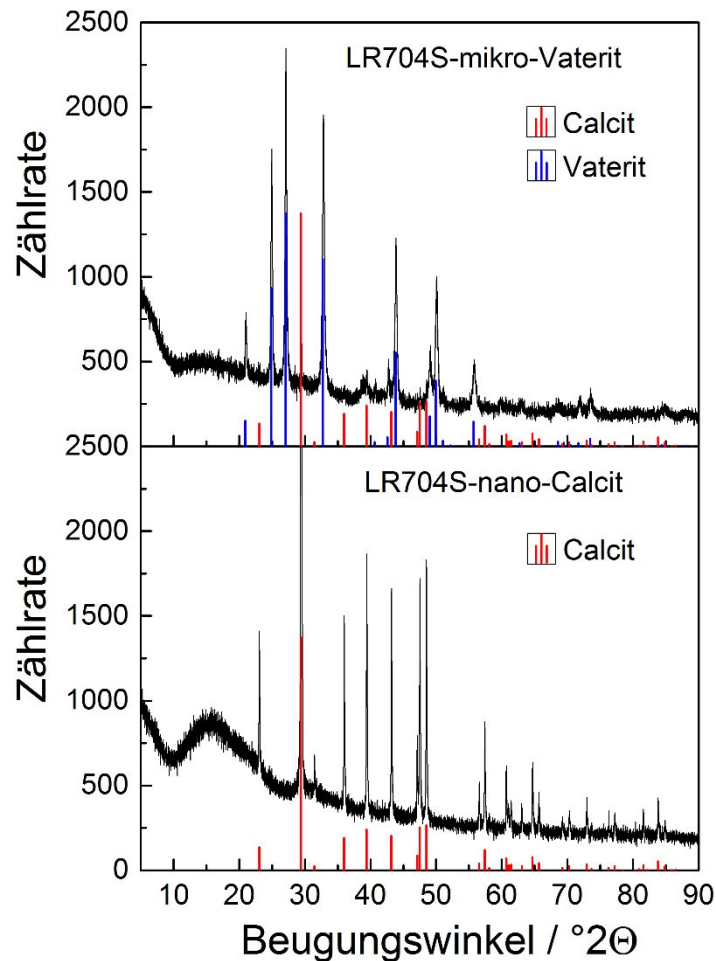


Abbildung 51: Röntgenpulverdiffraktogramm der LR704S-Calciumcarbonat-Mikropartikel. (Oben) LR704S-mikro-Vaterit- und (unten) LR704S-nano-Calcit-Mikropartikel mit den Referenzsignalen für Vaterit (blau) und Calcit (rot), entnommen aus der ICDD-Datenbank (Vaterit: 01-072-0506, Calcit: 00-005-0586).

Die LR704S-mikro-Vaterit-Mikropartikel zeigen die charakteristischen Signale für Vaterit (blau) und Calcit (rot). Die Röntgenpulverdiffraktometrie bestätigt also die in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtete unvollständige Phasenumwandlung des verwendeten Calciumcarbonats von Vaterit zu Calcit. Die LR704S-nano-Calcit-Mikropartikel zeigen hingegen ausschließlich die

charakteristischen Signale für Calcit. Für das Polymer (LR704S) sind für beide Mikrokomposite keine Reflexe zu beobachten. Die Synthese der Mikrokompositpartikel mittels der S/O/W-Emulsionstechnik hat also keinen Einfluss auf die Phasenzusammensetzung der Calcit-Nanopartikel, führt aber zu einer Phasenumwandlung von Vaterit in Calcit.

5.3.3.1.2 LR704S-Calciumphosphat-Mikropartikel (Vergleich von Hydroxylapatit-Nano- und β -Tricalciumphosphat-Mikropartikeln)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der LR704S-Calciumphosphat-Mikropartikel (Abbildung 52) zeigen sowohl für Hydroxylapatit-Nanopartikel (nano-HAP) als auch für β -Tricalciumphosphat-Mikropartikel (mikro- β -TCP) als anorganischer Komponente kugelförmige Mikrokompositpartikel. Die Partikelgrößenverteilung ist für HAP-Nanopartikel jedoch homogener. Die Mikrokompositpartikel liegen im Größenbereich von 10-80 μm mit einem Maximum bei 40 μm vor, während für β -TCP-Mikropartikel die Mikrokompositpartikel im Größenbereich von 10-100 μm mit zwei Maxima bei 20 und 40 μm vorliegen. Auch ein Vergleich der Oberflächen der Mikrokompositpartikel (Abbildung 52C und D) zeigt Unterschiede zwischen HAP-Nanopartikeln und β -TCP-Mikropartikeln. β -TCP-Mikropartikel haben eine geringe Affinität zu der Oberfläche der Polymerpartikel und liegen dort inhomogen verteilt vor. Im Vergleich dazu zeigen HAP-Nanopartikel eine deutlich höhere Affinität zu der Polymermatrix. Auf der Polymerpartikeloberfläche liegen HAP-Nanopartikel homogen verteilt vor und haben diese vollständig, teilweise in Multilagen, bedeckt. Die Übersichtsaufnahmen (Abbildung 52A und B) zeigen zudem, dass überschüssige HAP-Nanopartikel, die nicht in die Polymermatrix eingeschlossen wurden, durch den Aufreinigungsprozess mittels Sedimentieren und Abdekantieren von den Mikrokompositpartikeln getrennt werden konnten, während β -TCP-Mikropartikel sich nicht von den Mikrokompositpartikeln trennen ließen. Dies beeinträchtigte im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen mit Calciumcarbonaten (Vaterit-Mikropartikel) die Fließfähigkeit des resultierenden fein gemörserten Pulvers nicht (siehe Abbildung 58).

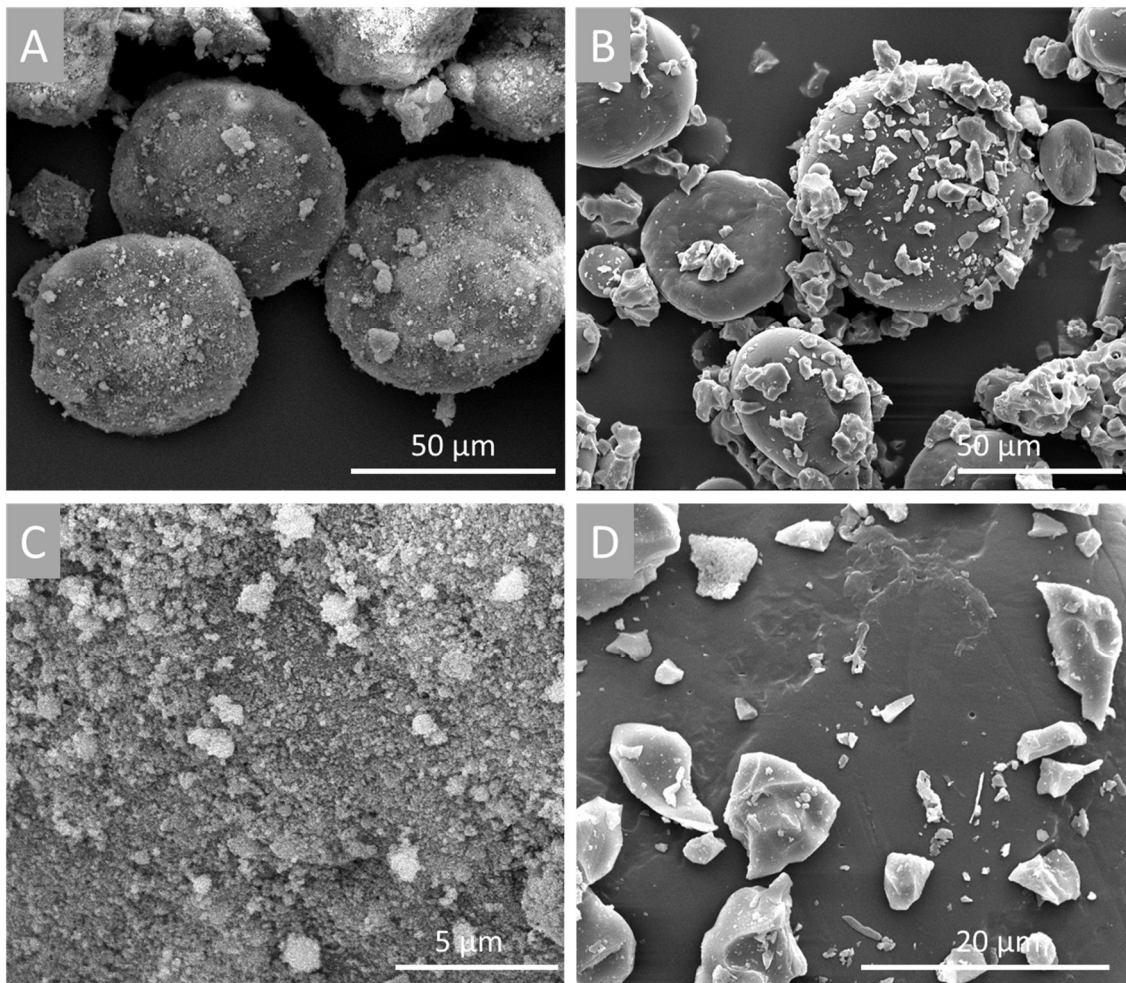


Abbildung 52: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der getrockneten und anschließend gemörserten LR704S-Calciumphosphat-Mikropartikel. (A) Übersichtsaufnahme bei 2000-facher Vergrößerung und (C) Nahaufnahme bei 16000-facher Vergrößerung der Partikeloberfläche der LR704S-nano-HAP-Mikropartikel. (B) Übersichtsaufnahme bei 1600-facher Vergrößerung und Nahaufnahme der LR704S-mikro- β -TCP-Mikropartikel bei 6000-facher Vergrößerung (D).

Die mit HAP-Nanopartikeln vollständig bedeckte und daher sehr raue (und hydrophile) Oberfläche der LR704S-nano-HAP-Mikropartikel sollte zudem das Anwachsen von Osteoblasten fördern und somit eine gute Osteokonduktivität gewährleisten. Insgesamt zeigten Calciumphosphate und Calciumcarbonate ein sehr ähnliches Verhalten. Nanopartikel ließen sich jeweils sehr gut in die Polymermatrix einbringen und bedeckten die Oberfläche der Mikrokompositpartikel homogen. Des Weiteren konnten sowohl überschüssige Calcit- als auch

HAP-Nanopartikel durch Sedimentieren und Abdekantieren von den Mikrokompositpartikeln getrennt werden. Die resultierenden Mikrokompositpulver waren beide fließfähig. Der Einsatz von Mikropartikeln resultierte hingegen sowohl für Calciumphosphate als auch für Calciumcarbonate in Mikrokompositpartikeln, die inhomogen auf der Mikrokompositpartikeloberfläche adsorbierten. Die Mikropartikel konnten zudem nicht durch Sedimentieren und Abdekantieren von den Mikrokompositpartikeln getrennt werden

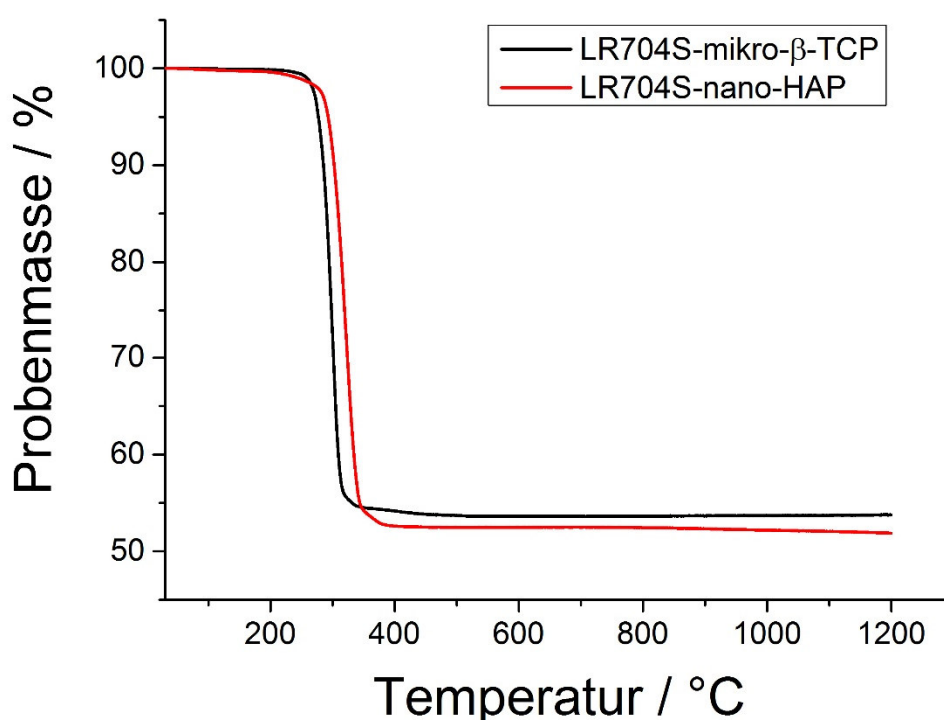


Abbildung 53: Thermogravimetrische Analyse der LR704S-nano-HAP-Mikropartikel (rot) und (schwarz) der LR704S-mikro- β -TCP-Mikropartikel.

Mittels Thermogravimetrie wurde die Zusammensetzung der beiden LR704S-Calciumphosphat-Mikropartikel untersucht und miteinander verglichen (Abbildung 53). Bei β -TCP-Mikropartikeln als anorganischer Komponente beträgt der Polymeranteil des Kompositpulvers 46,2 Gew.-% und der β -TCP-Anteil 53,8 Gew.-%. Dies entspricht in etwa den in der Synthese eingesetzten Massenverhältnissen von LR704S zu β -TCP von 50:50 Gew.-% und zeigt zusammen mit den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass überschüssige β -TCP-Mikropartikel nicht von den LR704S-mikro- β -TCP-Mikropartikeln getrennt werden konnten. Der Polymeranteil des LR704S-nano-HAP-Kompositpulvers beträgt

47,3 % und der Hydroxylapatit-Anteil 52,7 %. Auch dies entspricht den in der Synthese eingesetzten Massenverhältnissen von LR704S zu Hydroxylapatit von 50:50 Gew.-%. Da sich HAP-Nanopartikel jedoch gut von den LR704S-nano-HAP-Mikropartikeln mittels Sedimentieren und Abdekantieren abtrennen ließen und auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen keine überschüssigen Nanopartikel zu erkennen sind, wurden die Hydroxylapatit-Nanopartikel somit vollständig in die Polymermatrix eingebaut.

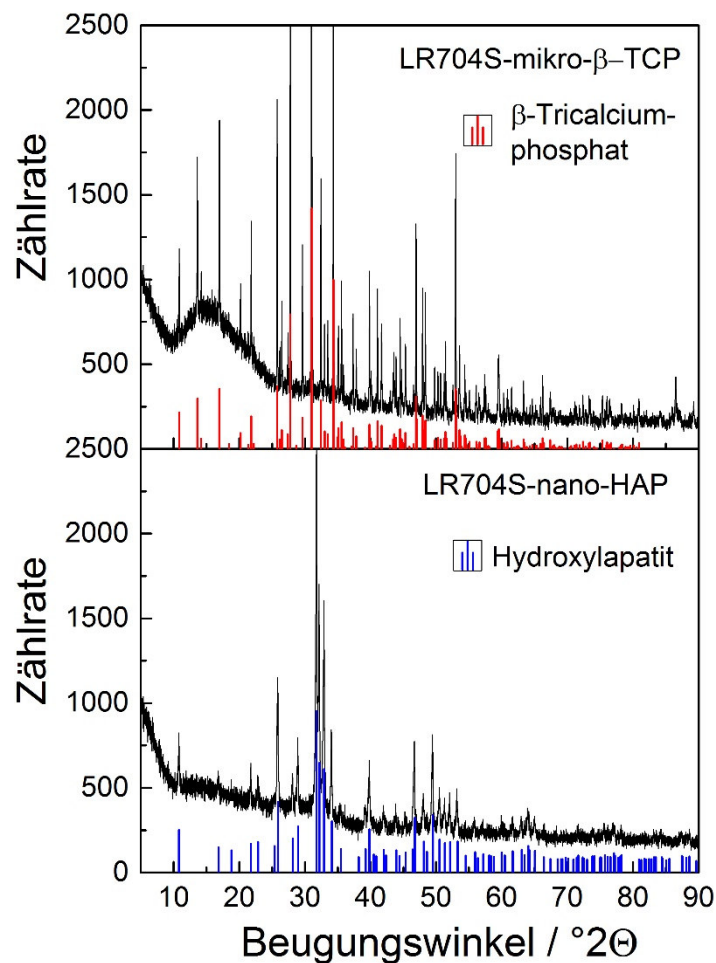


Abbildung 54: Röntgenpulverdiffraktogramme der LR704S-Calciumphosphat-Mikropartikel. (Oben) LR704S-mikro-β-TCP- und (unten) LR704S-nano-HAP-Mikropartikel mit den Referenzsignalen für Hydroxylapatit (blau) und β-Tricalciumphosphat (rot), entnommen aus der ICDD-Datenbank (Hydroxylapatit: 01-084-1998, β-Tricalciumphosphat: 01-070-2065).

Mittels Röntgenpulverdiffraktometrie wurde zudem eine Phasenanalyse (Abbildung 54) der beiden LR704S-Calciumphosphat-Mikropartikel durchgeführt. Die LR704S-mikro- β -TCP-Mikropartikel zeigen die charakteristischen Reflexe für β -Tricalciumphosphat (rot) und die LR704S-nano-HAP-Mikropartikel zeigen die charakteristischen Reflexe für Hydroxylapatit (blau). Für das Polymer LR704S sind für beide Mikrokomposite keine Signale zu beobachten. Die Synthese der Mikrokompositpartikel mittels der S/O/W-Emulsionstechnik führt somit im Gegensatz zu den LR704S-Calciumcarbonat-Mikrokompositen zu keiner Phasenumwandlung der verwendeten anorganischen Phase. Dies war aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität der verwendeten Calciumphosphate zu erwarten (siehe Abschnitt 2.3).

5.3.3.1.3 LR704S-Polymer-Mikropartikel

Um die durch die anorganischen (Nano-)Partikel bedingten Verbesserungen hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung, der mechanischen Stabilität, Osteokonduktivität und Pufferung der sauren Degradation mit reinen Polymerpartikeln vergleichen zu können, wurden als Vergleichssystem reine Polymer-Mikropartikel, wie in Abschnitt 4.3.1.2 beschrieben, mittels einer O/W-Emulsion synthetisiert.

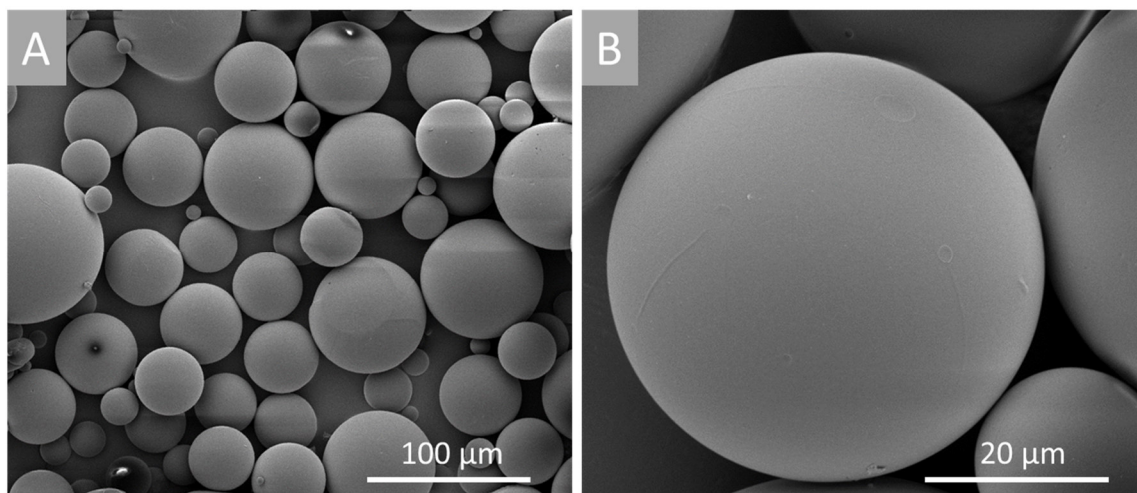


Abbildung 55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der reinen LR704S-Polymer-Mikropartikel bei 800-facher Vergrößerung (A) und bei 4200-facher Vergrößerung (B).

Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 55A und B) ist zu erkennen, dass die Polymer-Mikropartikel ohne Zusatz von anorganischen Partikeln eine sehr inhomogene Partikelgrößenverteilung aufweisen (siehe dazu auch Abbildung 57) und zudem eine sehr glatte Oberfläche besitzen. Da eine solche glatte Oberfläche für das Anwachsen von Osteoblasten nicht förderlich ist, sollten die reinen Polymer-Mikropartikel eine eher schlechte Osteokonduktivität besitzen.

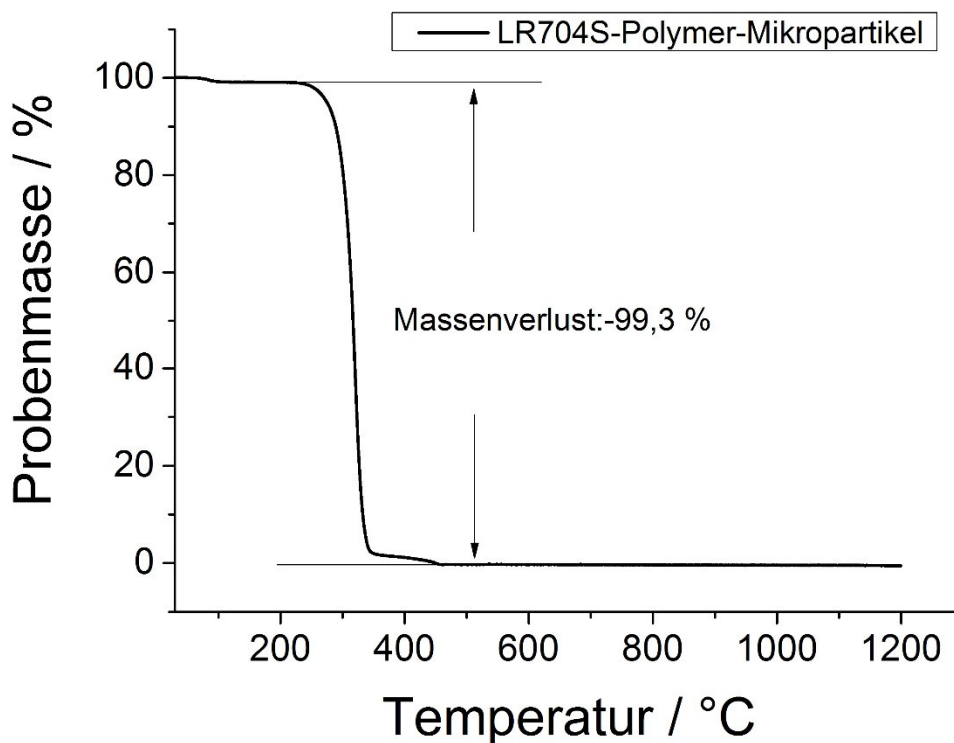


Abbildung 56: Thermogravimetrische Analyse der LR704S-Polymer-Mikropartikel.

Die thermogravimetrische Analyse (Abbildung 56) der reinen LR704S-Polymerpartikel zeigt einen Masseverlust von 99,3 % bei 270 °C. Die LR704S-Polymerpartikel bestehen folglich aus rein organischem Material und weisen keine anorganischen Verunreinigungen auf.

Ein abschließender Vergleich der Partikelgrößenverteilung der verschiedenen LR704S-Mikrokompositpartikel nach dem Mörsern zu einem feinen Pulver zeigt, dass der Zusatz von Calciumcarbonat als anorganische Komponente bei allen getesteten Zusammensetzungen zu einer homogenen Partikelgrößenverteilung führt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen zudem, dass nur

Nanopartikel (Calcit- und Hydroxylapatit-Nanopartikel) homogen die Oberfläche der Mikrokompositpartikel bedecken. Die Verwendung von Nanopartikeln als anorganische Komponente resultiert des Weiteren in einem rieselfähigen Mikrokompositpulver (siehe Abbildung 58), das für die Verarbeitung im SLS-Prozess geeignet ist. Nach dem Trocknungsvorgang war es bei allen Zusammensetzungen notwendig, die resultierenden Mikropartikel zu mörsern.

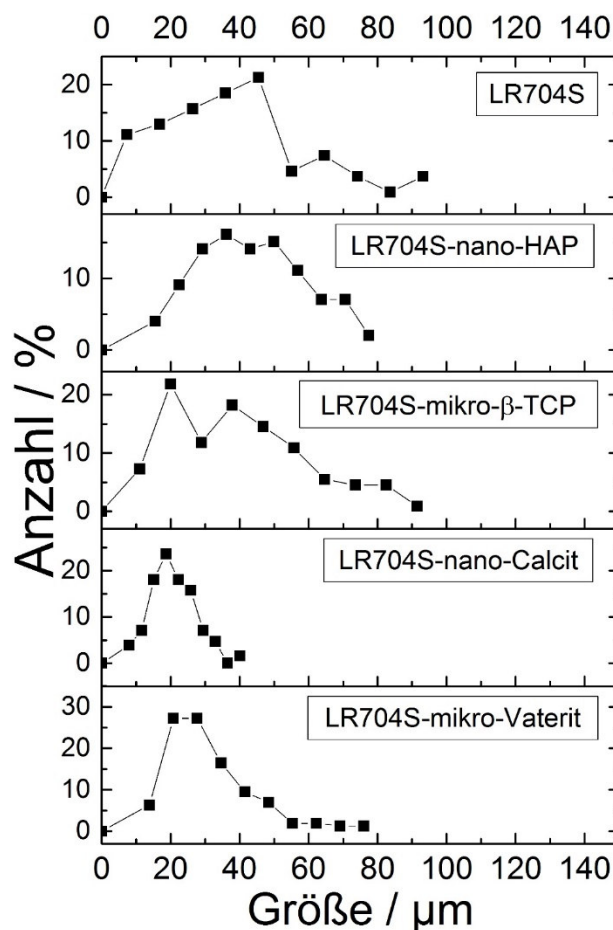


Abbildung 57: Vergleich der Partikelgrößenverteilung der verschiedenen LR704S-Mikrokompositpartikel nach der Trocknung und nach dem Mörsern zu einem feinen Pulver, bestimmt mittels Rasterelektronenmikroskopie.

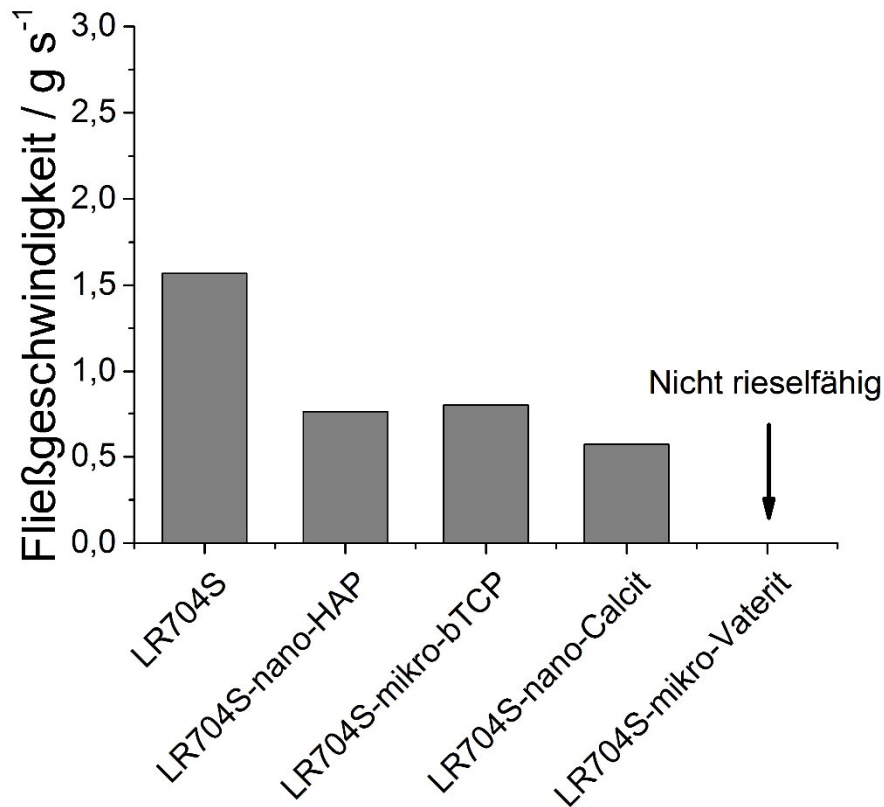


Abbildung 58: Vergleich der Rieselfähigkeit der verschiedenen LR704S-Mikrokompositpartikel nach der Trocknung und nach dem Mörsern zu einem feinen Pulver, bestimmt durch die Messung der Fließgeschwindigkeit in Anlehnung an Pharmacopoeia 5.0.^[178]

Für die Synthese von LR704S-Mikrokompositpartikeln mittels S/O/W-Emulsionen kann somit festgehalten werden, dass der Einsatz von HAP- und Calcit-Nanopartikeln als anorganischer Komponente zu Mikrokompositpartikeln führt, die zum einen einen hohen Keramikanteil besitzen und zum anderen eine für das Anwachsen von Zellen und für den SLS-Prozess geeignete Morphologie aufweisen.

5.3.4 Untersuchung der mechanischen Eigenschaften

Nachdem die Mikrokompositpartikel eingehend mittels Rasterelektronenmikroskopie hinsichtlich ihrer Morphologie und Eignung für den selektiven Lasersinterprozess charakterisiert wurden, war es nun erforderlich, die mechanischen Eigenschaften der Komposite zu untersuchen und mit den Kenndaten für humane Knochen zu vergleichen. Abhängig vom Implantationsort ist das Implantat unterschiedlichen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt und sollte daher ähnliche Werte für die Bruchfestigkeit und den *E*-Modul aufweisen wie das umliegende Knochengewebe. Aufgrund der Anisotropie des Knochens ist es jedoch schwierig, den *E*-Modul für Knochen anzugeben. Für kompakten Knochen (*Corticalis*) beträgt der *E*-Modul ca. 5-25 GPa, während er für spongiösen Knochen (*Spongiosa*) <1 GPa beträgt (siehe Abbildung 61).^[12, 27, 251] Ist der *E*-Modul eines Implantates beispielsweise deutlich kleiner als der des umliegenden Knochengewebes, so kann das Implantat keine Kräfte aufnehmen und würde als lasttragendes Implantat versagen. Weist der *E*-Modul jedoch deutlich größere Werte auf als das umliegende Knochengewebe, so kommt es zum sogenannten *stress shielding*. In diesem Fall nimmt das Implantat verhältnismäßig zu viel Kraft auf und entlastet den umliegenden Knochen. Der Knochen (siehe Abschnitt 2.5.3) bildet sich als adaptives Gewebe folglich durch die Entlastung zurück und verliert stark an Dichte. Zusätzlich wird das mit dem Implantat in Kontakt stehende und Kraft einbringende Knochengewebe unverhältnismäßig stark belastet und nutzt sich folglich ab. Dies kann zu einer Dislokation des Implantates führen.^[13, 27, 251]

Die mechanischen Eigenschaften (*E*-Modul und die maximale Biegespannung) der Kompositmaterialien wurden mittels Dreipunktbiegeversuchen (siehe Abschnitt 4.3.2) untersucht. Hierzu wurden aus den mittels S/O/W-Emulsion synthetisierten Mikrokompositpulver zunächst Probekörper (80·10·4 mm³) gemäß der ISO-EN-Norm 178 für Kunststoffe mittels Heißpressen (Abbildung 59) hergestellt.

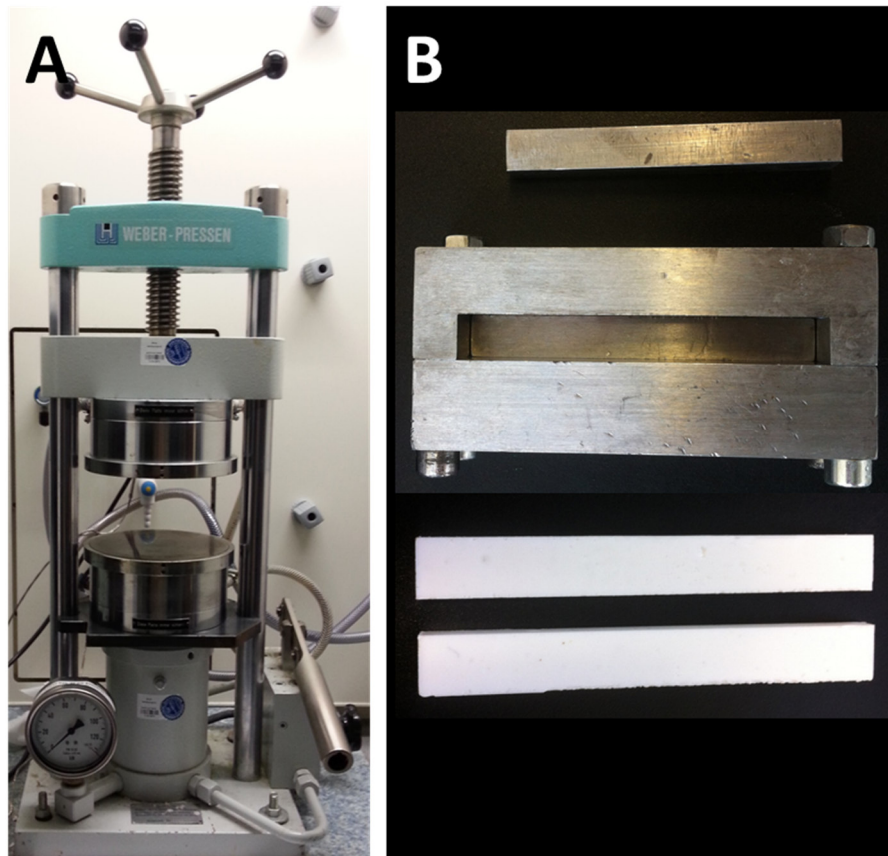


Abbildung 59: (A) Heißpresse der Firma Weber. (B) Formkörper und die resultierenden Probekörper mit einer Größe von $80 \cdot 10 \cdot 4 \text{ mm}^3$.

Die Dreipunktbiegeversuche an den Probekörpern wurden anschließend gemäß der ISO-EN-Norm 178 für Kunststoffe mit einer mechanischen Prüfmaschine der Firma Shimadzu durchgeführt. Die Probekörper hatten alle eine Größe von ca. $80 \cdot 10 \cdot 4 \text{ mm}^3$, wobei der Abstand zwischen den Auflageflächen (Stützweite bzw. *Gauge-Length*) 72 mm betrug. Die Testgeschwindigkeit des Prüfstempels betrug 2 mm s^{-1} .

In Abbildung 60 sind beispielhaft die Kraft-Weg-Diagramme der LR704S-Polymer- (Abbildung 60A) und der LR704S-mikro-Vaterit-Probekörper Abbildung 60B) gezeigt.

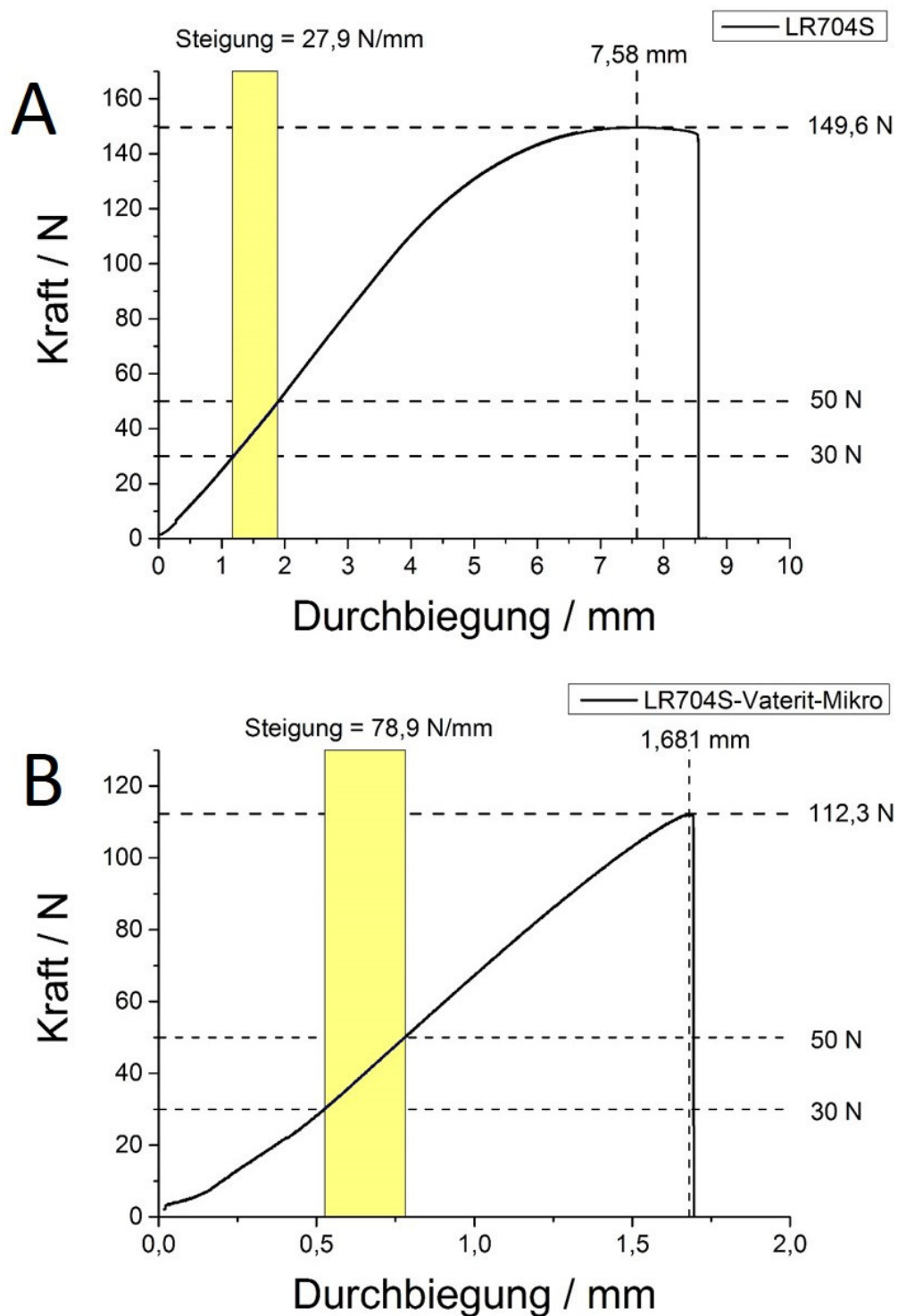


Abbildung 60: Kraft-Weg-Diagramme der LR704S-Probekörper. (A) LR704S-Polymer- und (B) LR704S-mikro-Vaterit-Probekörper.

Tabelle 3: *E*-Moduln der LR704S-Mikrokomposite mittels Dreipunktbiegeversuchen nach der ISO-EN-Norm 178 für Kunststoffe bestimmt.

Probenzusammensetzung	<i>E</i> -Modul / GPa
LR704S-Polymer	1,09
LR704S-nano-HAP	6,95 ± 0,14
LR704S-mikro-Vaterit	7,24 ± 0,28

Der Elastizitätsmodul der heißgepressten Werkstücke wurde anhand der Steigung ($\frac{\Delta F}{\Delta l}$) der Messkurve des Kraft-Weg-Diagramms im Proportionalitätsbereich durch Gleichung 7 bestimmt. Abbildung 60 und Tabelle 3 zeigt die mittels Gleichung 7 bestimmten *E*-Moduln der verschiedenen Probekörper. Für reines Polymer wurde nur $N = 1$ Probekörper gefertigt, da es sich als sehr schwierig erwies, Luftblasen im Inneren der Probekörper zu vermeiden. Für die übrigen Kompositmaterialien wurden $N = 3$ Probekörper gefertigt. Es ist zu erkennen, dass durch den Zusatz von Hydroxylapatit-Nanopartikeln und Calciumcarbonat-Mikropartikeln die *E*-Moduln um den Faktor 6 bis 8 erhöht werden konnten. Es ist jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Keramiken zu erkennen. Calciumcarbonat-Mikropartikel erhöhen den *E*-Modul der Komposite genauso wie Hydroxylapatit-Nanopartikel. Im Vergleich mit den Kennwerten für kompakten, spongiösen und gesamten Knochen liegen die *E*-Moduln der heißgepressten Komposit-Probekörper (7-8 GPa) im unteren Größenbereich von kompakten Knochen (5-21 GPa) und im gleichen Größenbereich wie der gesamte Knochen ($10,3 \pm 5,7$ GPa).^[27, 251]

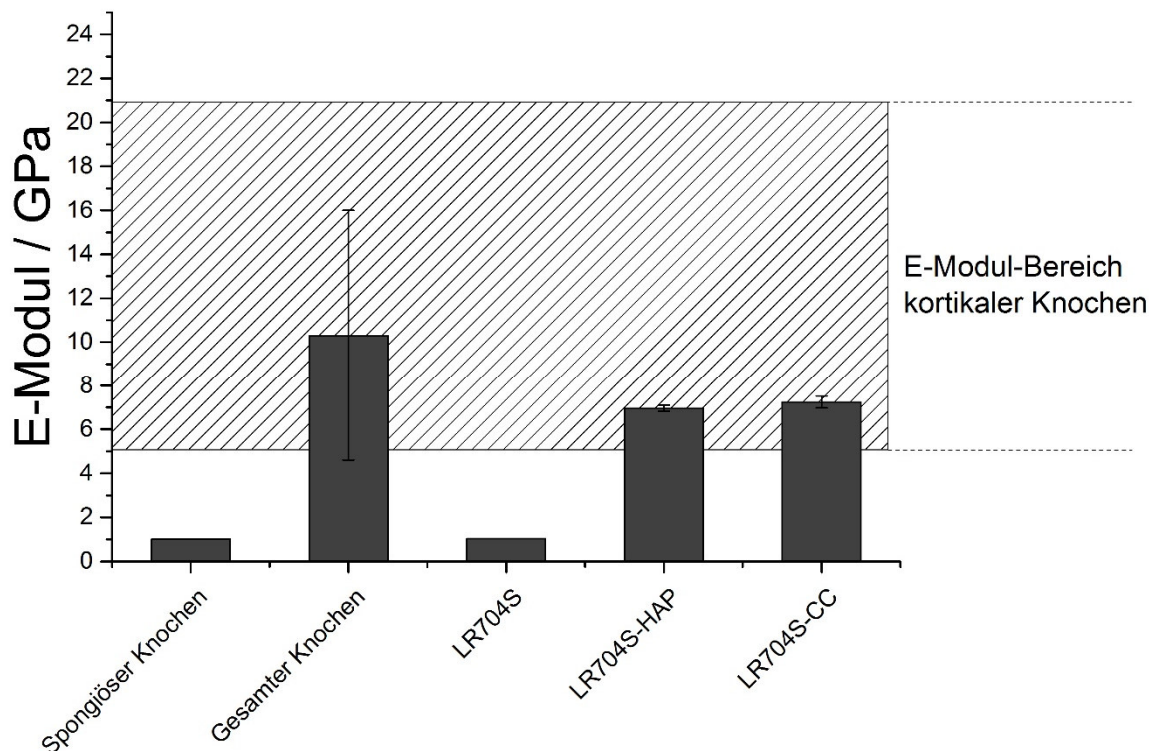


Abbildung 61: E-Moduln der Probekörper im Vergleich zu den Kennwerten für spongiösen Knochen, kortikalen Knochen und gesamten Knochen.^[27, 251]

Die mittels S/O/W-Emulsionen synthetisierten und anschließend mittels Heißpressen zu Probekörpern verarbeiteten Mikrokompositpartikel eignen sich somit von den mechanischen Eigenschaften her alle als Knochenersatzmaterial. Die Prozessierbarkeit im SLS-Prozess sollte zudem die Anfertigung von patientenspezifischen Implantaten ermöglichen.

5.3.5 Untersuchung der biologischen Effekte im Zellkulturexperiment

Neben den mechanischen Kenngrößen ist die Gewebeverträglichkeit der Knochenersatzmaterialien von entscheidender Bedeutung. Die Gewebeverträglichkeit wird in der Regel zunächst *in-vitro* in Zellkulturexperimenten getestet. Dabei sollten Zellen verwendet werden, die auch am Implantationsort in Kontakt mit dem zu testenden Material stehen (z.B. Osteoblasten bzw. Osteoklasten für den Knochenkontakt oder Thrombozyten für den Blutkontakt). Als Beurteilungskriterien dienen meist quantitative Methoden wie die Bestimmung der Proliferation über die Zellanzahl pro Quadratmillimeter auf der Implantatoberfläche oder die Bestimmung der Zytotoxizität über die Messung spezifischer Stoffwechsel-

reaktionen der Zelle (z.B. MTT-Test). Aber auch qualitative Methoden, wie die Beurteilung von Zellschädigungen aufgrund von morphologischen Veränderungen sind als Prüfverfahren akzeptiert. Die im Folgenden gezeigten Untersuchungen der biologischen Effekte im Zellkulturexperiment wurden in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993-5 für die Beurteilung von Medizinprodukten durchgeführt. Da die entwickelten Mikrokompositmaterialien als Knochenersatzmaterial dienen sollen, wurden die Zellkulturexperimente in direktem Materialkontakt mit Osteoblasten (murine MC3T3-Zellen) durchgeführt. Dafür wurde das Kompositpulver mit einer Heißpresse zu einem zylinderförmigen Pressling in eine für die Zellkulturgefäße geeignete Größe gepresst (1 cm Durchmesser, 0,25 cm Höhe). Diese Presslinge wurden dann in die *well*-Platten für die Zellkulturexperimente gegeben und dienten als Substrat für die MC3T3-Zellen. Als Kontrollexperiment wurde Glas mit der gleichen Geometrie sowie der mit Poly(L-Lysin) beschichtete Boden der *well*-Platten als Substrat für die MC3T3-Zellen verwendet. Zur Visualisierung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop wurde der Zellkern mit DAPI blau gefärbt (siehe 4.3.3.1). Für die qualitative Beurteilung der Zellmorphologie wurde zudem das Aktin-Zytoskelett der Zellen mittels Phalloidin grün gefärbt. Die Auswertung erfolgte im Anschluss mit Hilfe des Programms *ImageJ*, mit dem die Zellkerne auf den Fluoreszenzbildern automatisch ausgezählt werden können, so dass die Zellanzahl pro Quadratmillimeter bestimmt werden konnte (Abbildung 63).

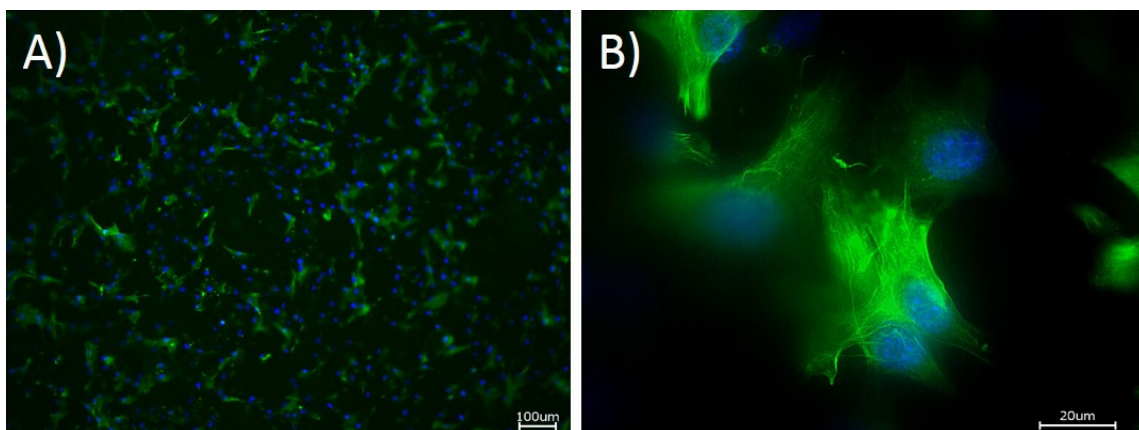


Abbildung 62: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MC3T3-Zellen nach Inkubation auf den Oberflächen der Presslinge (A) Übersichtsaufnahme bei 10-facher Vergrößerung und (B) Nahaufnahme bei 100-facher Vergrößerung. Der Zellkern wurde blau (DAPI) und das Aktinzytoskelett (Phalloidin) grün angefärbt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (in Abbildung 62) zeigen für alle getesteten Zusammensetzungen vitale MC3T3-Zellen mit einer langgezogenen und spindelförmigen Morphologie mit feinen Ausläufern. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 63 und 64) zeigen nach 36 h Wachstum von MC3T3-Zellen auf der Oberfläche der Presslinge für alle Mikrokomposit-Presslinge eine dichte Zellbesiedlung im Vergleich zu reinen Polymer-Presslingen.

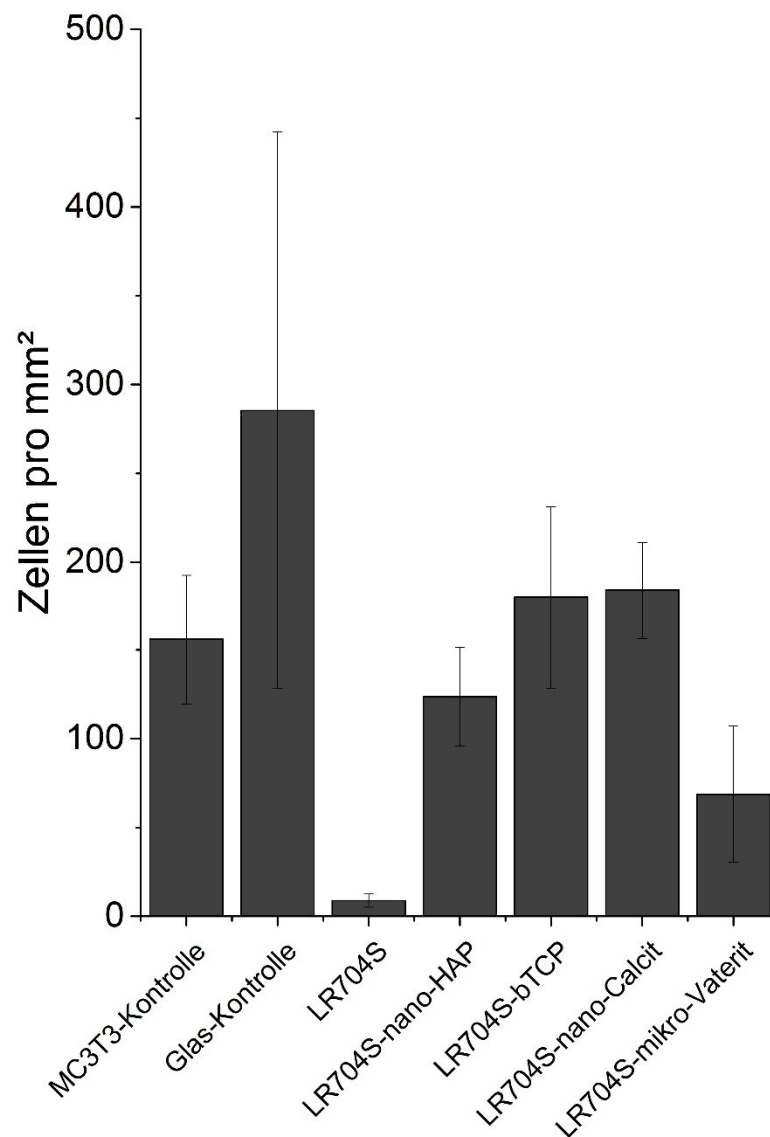


Abbildung 63: Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder der LR704S-Presslinge. Die Zellanzahl wurde über die Anzahl an Zellkernen (blau) bestimmt und mittels der Software *ImageJ* ausgezählt.

Wie in 5.3.1 bereits beschrieben wurde, ist die Adhäsion von Osteoblasten an Oberflächen besonders von der Benetzbarkeit mit Wasser (Hydrophilie) und von der Oberflächenbeschaffenheit (Rauigkeit) der Materialien abhängig. Vergleicht man die Oberflächenbeschaffenheit der reinen Polymer-Presslinge mit denen der Mikrokompositpresslinge, so ist zu erkennen, dass insbesondere durch die Zugabe von Nanopartikeln (Hydroxylapatit und Calcit) die Oberflächenrauigkeit stark zugenommen hat.

Tabelle 4: Proliferation von MC3T3-Zellen auf der Oberfläche der LR704S-Mikrokomposite mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Probenzusammensetzung	Zellen mm ⁻²
LR704S-Polymer	9±4
LR704S-nano-HAP	124±28
LR704S-mikro-β-TCP	180±51
LR704S-nano-Calcit	184±27
LR704S-mikro-Vaterit	68±38

Auf der hydrophoben Oberfläche der reinen LR704S-Polymer-Presslinge proliferierten die MC3T3-Zellen nur sehr schlecht (9±4 Zellen pro mm²). Durch den Zusatz von Hydroxylapatit-Nanopartikeln konnte die Zellanzahl bei LR704S-nano-HAP-Presslingen auf 124±28 Zellen pro mm² gesteigert werden. Auch der Zusatz von β-TCP-Mikropartikeln bewirkte eine starke Erhöhung der Zelldichte auf 180±51 Zellen pro mm². Der Zusatz von Vaterit-Mikropartikeln bei LR704S-mikro-Vaterit-Presslingen bewirkte hingegen nur eine Steigerung auf 68±38 Zellen pro mm², also ca. um den Faktor 2,6 weniger als bei β-TCP-Mikropartikeln. Der Zusatz von Calcit-Nanopartikeln bewirkte hingegen eine deutliche Steigerung der Zellanzahl auf 184±27 Zellen pro mm². Die Proliferation der MC3T3-Zellen konnte also durch die Verwendung von Calcit-Nanopartikeln im Vergleich zu Vaterit-Mikropartikeln ca. um den Faktor 3 gesteigert werden. Durch den Zusatz der anorganischen Bestandteile konnte folglich die Zellanzahl auf der Oberfläche der Presslinge im Vergleich zu reinen Polymerpartikeln stark erhöht werden.

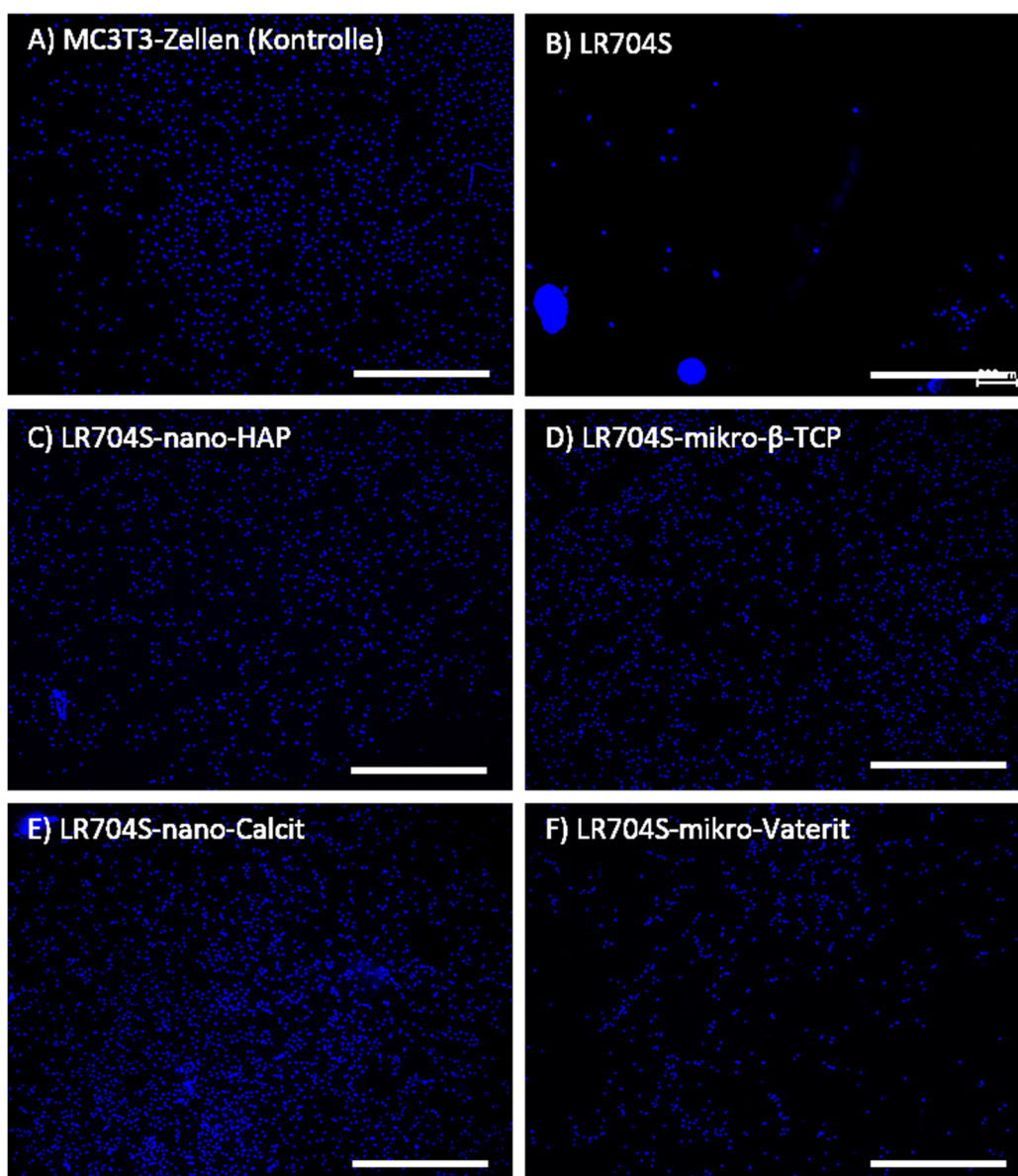


Abbildung 64: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MC3T3-Zellen nach 36 h Inkubation auf den Oberflächen der Presslinge, hergestellt aus den jeweiligen LR704S-Mikrokompositpartikeln. Zur Visualisierung der Zellen wurde der Zellkern jeweils blau (DAPI) angefärbt. Der Maßstab entspricht jeweils 1 mm.

5.3.6 Untersuchung der sauren Degradation von LR704S-Mikrokompositen

Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben wurde, gehören aliphatische Polyester auf der Basis von Polylactid zu der Klasse der biodegradierbaren Polymere. Aus chemischer Sicht handelt es sich bei der Degradation von Polylactiden um eine hydrolytische Ester-Spaltung im Polymerrückgrat. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Esterhydrolyse ist im Wesentlichen von der Kristallinität, der Temperatur und

vom pH-Wert abhängig. Die Esterhydrolyse kann sowohl Säure- als auch Base-katalysiert ablaufen (siehe Abbildung 65), wobei für die Degradation von Knochenersatzmaterialien auf der Basis von Polylactiden insbesondere die säure-katalysierte Esterhydrolyse von Interesse ist.

Säurekatalysierte Esterhydrolyse

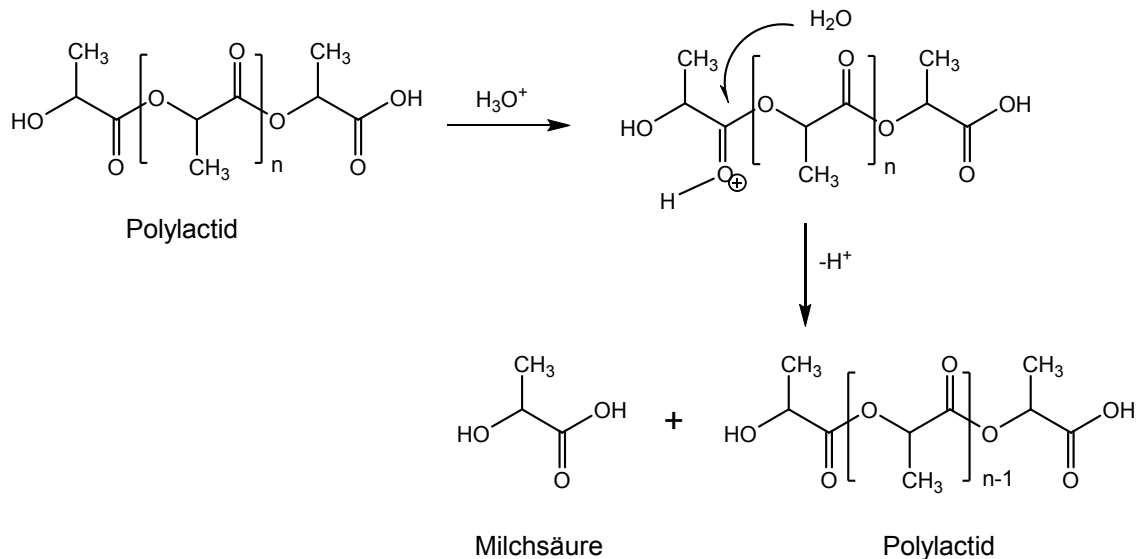


Abbildung 65: Reaktionsmechanismus der säurekatalysierten Degradation von Polylactid zu Milchsäure.

Die Degradation von Implantaten auf der Basis von Polylactiden läuft wie in Abschnitt 2.2 beschrieben im gesamten *bulk*-Material ab, da die Diffusion von Wasser bzw. von Körperflüssigkeiten in das Innere des Implantates schneller verläuft als die Ester-Spaltung an der Oberfläche. Nach Lee *et al.* unterscheidet man drei Phasen der Implantat-Degradation.^[252] Die erste Phase ist die Inkubation. Dabei diffundieren Wasser bzw. Körperflüssigkeiten in die Polymermatrix ein, ohne dass sich das Molekulargewicht des Polymers verändert. Es findet also noch keine Esterhydrolyse statt. Typischerweise wird hier eine Gewichtszunahme des Implantatwerkstückes durch den erhöhten Wasseranteil beobachtet. Die zweite Phase ist die Induktion, bei welcher der Wasseranteil in der Polymermatrix stark ansteigt, bis er eine Sättigung erreicht hat. Des Weiteren beginnt hier die Esterhydrolyse, und das Molekulargewicht des Polymers nimmt ab, ohne dass sich jedoch die Gesamtmasse des Implantates verändert. Die Degradationsprodukte verbleiben also noch im Material. Dadurch verändert sich

der pH-Wert im Implantat selbst, so dass die säurekatalysierte Degradation (siehe Abbildung 65) der vorherrschende Degradationsmechanismus ist. Die dritte Phase ist die Erosion, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Säurekatalysierte Esterspaltung zunimmt und das Implantat sukzessive abgebaut wird. Durch den Abtransport der Degradationsprodukte nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab. Bei großen Implantaten kann dieses Phänomen zu pH-Gradienten im Implantat selbst führen, da der Abtransport im äußeren Bereich schneller erfolgt als im Inneren.^[253] Dadurch können sich im Inneren des Implantates flüssige Degradationsprodukte bilden.^[253] Degradiert nun die äußere Schale, so können schlagartig große Mengen Milchsäure freierwerden und den pH-Wert am Implantationsort drastisch absenken, so dass es mit großer Wahrscheinlichkeit zu Osteolyse und Azidose kommt. Eine gängige Methode die saure Degradation und das Problem der daraus resultierenden Implantat-Erosion zu verhindern, ist der Zusatz von basischen Puffersubstanzen wie Calciumcarbonat.^[23, 24, 31, 32] Da die Degradation eines Implantatwerkstückes ein solch komplexer Vorgang ist, der von vielen Faktoren beeinflusst wird, ist die Vorhersage der Degradationskinetik sehr schwierig. Die *in vitro*-Untersuchung der Degradation ist daher ein wichtiges Experiment für die vollständige Charakterisierung eines Biomaterials.

5.3.6.1 Untersuchung des Degradationsverhaltens bei 70 °C

Da bei der Degradation makroskopischer Implantate auf der Basis von Polylactiden die enzymatische Degradation nur eine untergeordnete Rolle spielt, lassen sich die Degradationseigenschaften von Polylactiden mit *in vitro*-Experimenten gut simulieren.^{[252],[254]} Dazu sollten für eine Übertragbarkeit in *in vivo*-Studien möglichst physiologische Degradationsbedingungen gewählt werden. In der ISO-Norm 13781 „*Poly(L-lactide) resins and fabricated forms for surgical implants - In vitro degradation testing*“ werden folglich eine Temperatur von 37 °C und eine Lösung mit einem physiologischen pH-Wert von 7,4 vorgeschrieben. In Körperflüssigkeiten degradieren Polylactide, wie in Abschnitt 2.2 und Abschnitt 5.3.1 erläutert wurde, durch basen- und säurekatalysierte Esterhydrolyse. Dies ist für makroskopische Implantatwerkstoffe jedoch ein sehr langwieriger Prozess, insbesondere wenn die Implantate aus langsam degradierenden Polylactiden gefertigt werden. Die Degradation kann in diesem Fall länger als drei Jahre dauern. Daher gibt es in der ISO-Norm 13781 eine Vorschrift für beschleunigte Degradationsexperimente bei 70 °C, um das Degradationsverhalten qualitativ nachzuverfolgen. Es sei jedoch an dieser Stelle darauf aufmerksam gemacht, dass eine Übertragung auf das *in vivo*-Degradationsverhalten problematisch ist, weil die Reaktionsgeschwindigkeiten der verschiedenen Reaktionen stark temperaturabhängig sind. Des Weiteren können Phasenübergänge (z.B. Glasübergang beim Überschreiten der Glasübergangstemperatur oder Schmelzen beim Überschreiten der Schmelztemperatur) auftreten und das Degradationsverhalten maßgeblich verändern. Im Folgenden sind die Ergebnisse der beschleunigten Degradationsexperimente exemplarisch anhand der LR704S-nano-HAP- (als Beispiel für Calciumphosphat als anorganische Komponente) und der LR704S-mikro-Vaterit-Werkstücke (als Beispiel für Calciumcarbonat als anorganische Komponente) im Vergleich zu reinen Polymerwerkstücken gezeigt.

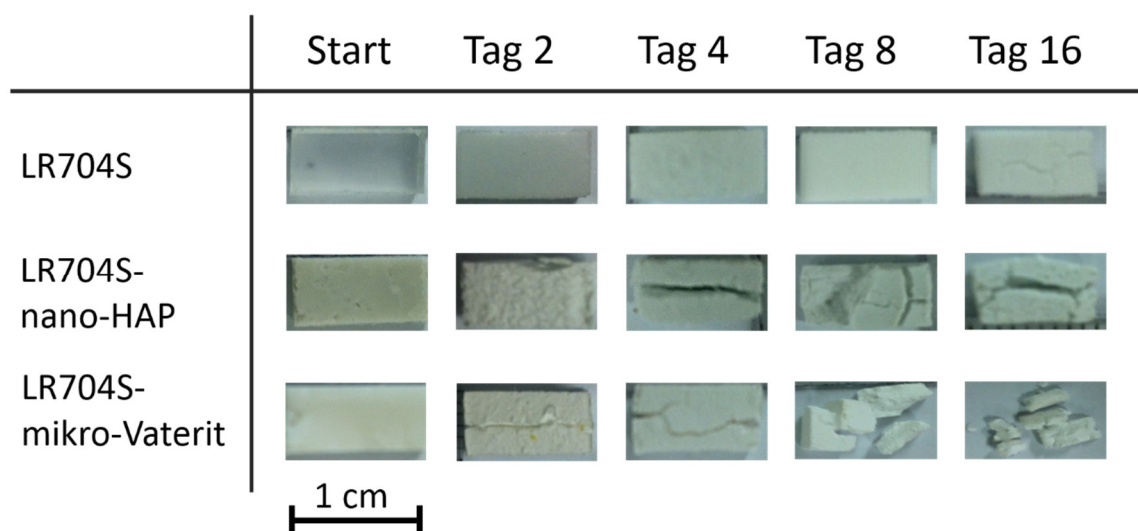


Abbildung 66: Fotos der LR704S-Werkstücke nach der Inkubation bei 70 °C in physiologischer Kochsalzlösung nach definierten Zeitpunkten. Der Maßstab entspricht 1 cm.

In Abbildung 66 sind die Werkstücke der verschiedenen LR704S-Mikrokompositpartikel vor und nach der Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung gezeigt. Die Werkstücke zeigen sichtbare Veränderungen im Verlauf der Degradation bei 70 °C. Es ist zu erkennen, dass die Werkstücke mit Calciumcarbonat oder Calciumphosphat als anorganische Komponente deutlich stärker und schneller aufquellen als das reine Polymer. Dieses Verhalten wird auch bei der Auftragung des Wassergehaltes der Werkstücke in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Abbildung 67) deutlich. Werkstücke aus reinem Polymer zeigen die charakteristische Inkubationsphase, gefolgt von einem starken Anstieg im Wassergehalt. Werkstücke, die aus Kompositmaterial gefertigt wurden, zeigen hingegen eine sofortige und über den Versuchszeitraum stetige Wasseraufnahme. Dieses Phänomen lässt sich mit der gleichmäßigen Verteilung der hydrophilen Keramiken im Werkstück erklären, wodurch Wasser bzw. Körperflüssigkeiten gleichmäßig in das Werkstück eindiffundieren können.

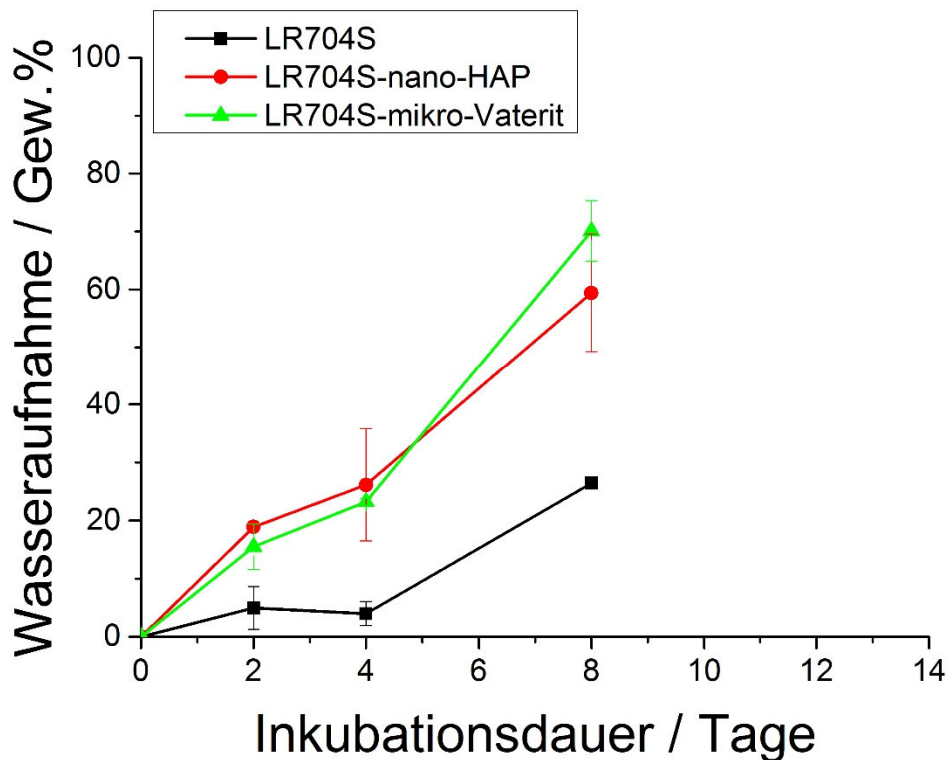


Abbildung 67: Darstellung der Wasseraufnahme der verschiedenen LR704S-Mikrokomposite in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 70 °C in physiologischer Kochsalzlösung. Die Daten beziehen sich jeweils auf das Massenverhältnis der degradierten Presslinge vor und nach der Trocknung nach 2, 4, 6 bzw. 8 Tagen Inkubation.

Für diese Untersuchungen wurden die Werkstücke zu jedem Untersuchungszeitpunkt der Inkubationslösung entnommen, oberflächlich mit einem Papiertuch abgetrocknet und im nassen Zustand gewogen. Anschließend wurden die Werkstücke bis zur Gewichtskonstanz bei 37 °C im Trockenschrank getrocknet, erneut gewogen und schließlich das Massenverhältnis des degradierten Presslings vor und nach der Trocknung bestimmt. Aus diesen Werten lässt sich schließlich die Wasseraufnahme in Gewichtsprozent und der Massenverlust im Vergleich zur Ausgangsmasse bestimmen. Bei der Auftragung des Massenverlustes in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Abbildung 68) wird ein ähnliches Verhalten der Werkstücke wie bei der Auftragung des Wassergehaltes in Abhängigkeit der Inkubationsdauer ersichtlich. Die Massenabnahme erfolgt bei den Werkstücken, die aus den Mikrokompositpartikeln gefertigt wurden, ohne Induktionsphase und stetig über den gesamten Versuchszeitraum. Der

Abtransport der Degradationsprodukte kann bei den Kompositwerkstücken an der Grenzfläche zwischen Calciumphosphat-Nano- und Calciumcarbonat-Mikropartikeln und Polymer erfolgen und wird zudem durch die homogene Wasseraufnahme begünstigt.

Bei Werkstücken, die aus reinen Polymermikropartikeln gefertigt wurden, ist hingegen eine Induktionsphase bis Tag 4 zu erkennen. Erst danach erfolgt der Massenverlust.

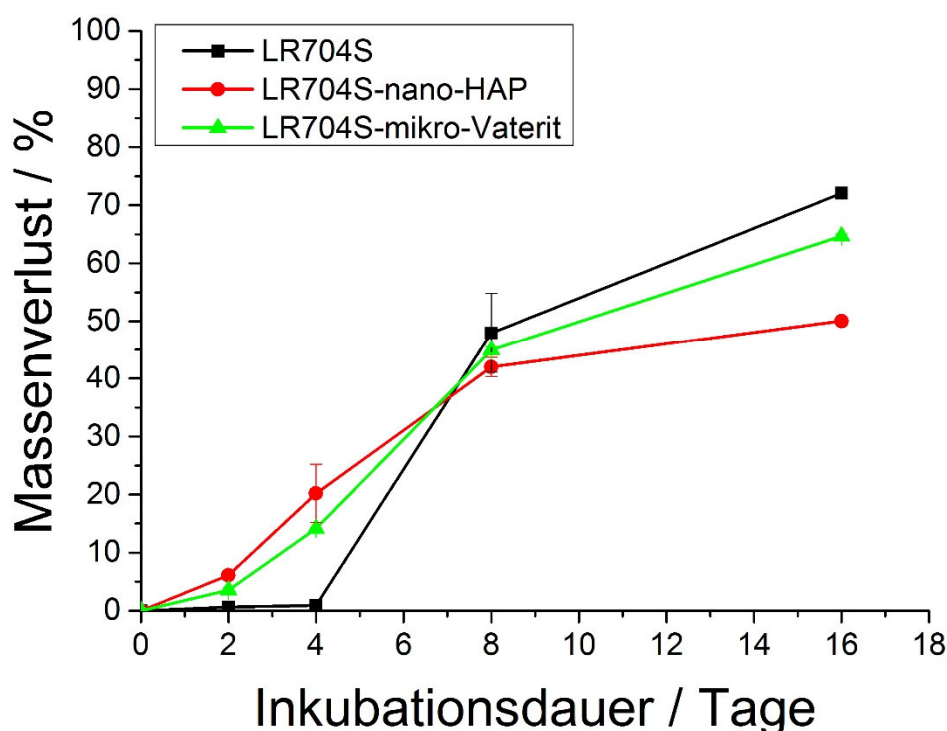


Abbildung 68: Darstellung des Massenverlustes der verschiedenen LR704S-Mikrokomposite in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 70 °C in physiologischer Kochsalzlösung. Die Daten beziehen sich jeweils auf die Masse der degradierten Presslinge nach der Trocknung nach 2, 4, 6 bzw. 8 Tagen Inkubation in Bezug auf die Ausgangsmasse des Presslings ($m(t=0)$).

Die Untersuchungen des pH-Wertes (siehe Abbildung 69) zu den jeweiligen Zeitpunkten ergaben, dass die Werkstücke ohne Zusatz von Calciumcarbonat (LR704S alleine und LR704S-nano-HAP) die saure Degradation des Polylactides nicht abpuffern können. So sinkt der pH-Wert des Implantatwerkstückes, das nur aus LR704S gefertigt wurde, auf pH = 2,3 und der pH-Wert des LR704S-nano-

HAP-Komposit-Werkstückes auf pH = 3,5 nach 32 Tagen Inkubation bei 70 °C in physiologischer Kochsalzlösung.

Erst die Werkstücke, die aus den LR704S-mikro-Vaterit-Mikropartikeln (mit 50 Gew.-% Calciumcarbonat) gefertigt wurden, zeigen mit einem pH-Wert von 6,9 eine ausreichende Pufferkapazität, um die saure Degradation des LR704S zu unterdrücken.

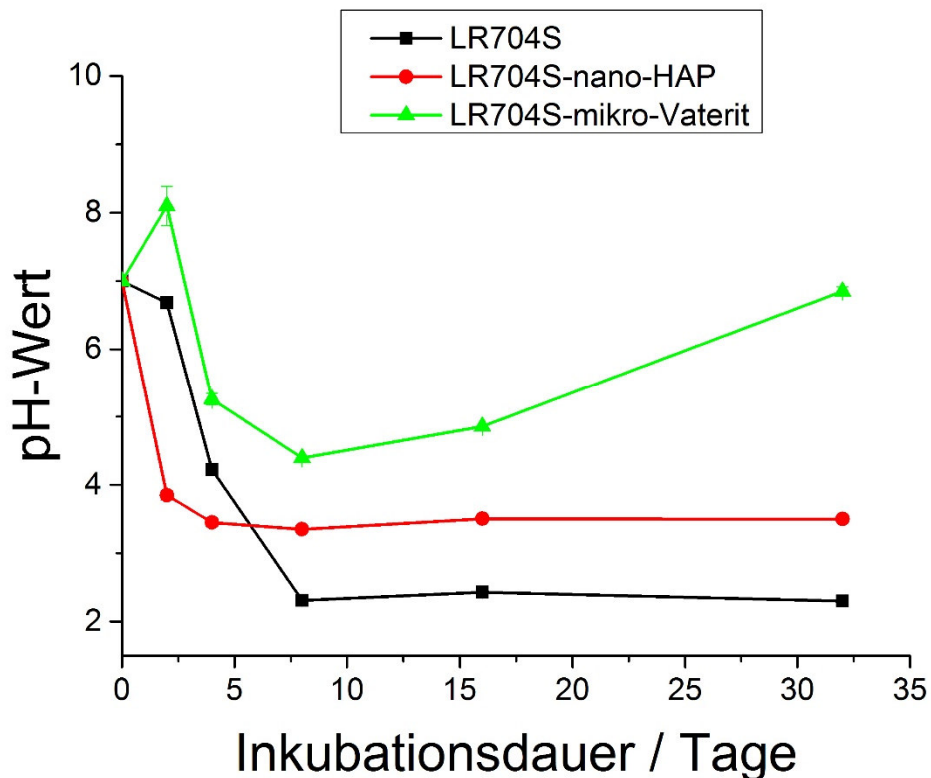


Abbildung 69: Degradationsuntersuchungen der verschiedenen LR704S-Mikrokomposite bei 70 °C in physiologischer Kochsalzlösung.

5.3.7 *Pickering*-Emulsion

Pickering-Emulsionen sind Emulsionen (Öl-in-Wasser, Wasser-in-Öl oder multiple Emulsionen (z.B. Wasser-in-Öl-in-Wasser)), die durch (Nano-)Partikel stabilisiert werden.^[191] In klassischen Emulsionstechniken werden üblicherweise Tenside als Emulsionsstabilisatoren eingesetzt (siehe Abbildung 70), die je nach Verwendungszweck durch zeitaufwendige Aufreinigungsmethoden von den resultierenden Partikeln abgetrennt werden müssen. Insbesondere für Synthesen im Industriemaßstab (Kilogramm-Maßstab) ist es daher sinnvoll, mit möglichst wenigen Prozessschritten während der Synthesen auszukommen.

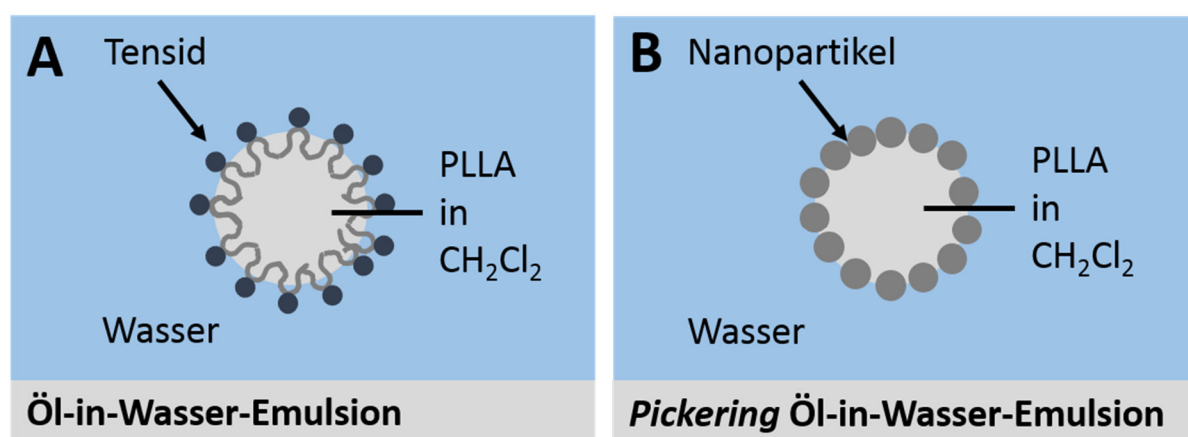


Abbildung 70: Schematische Darstellung der klassischen Öl-in-Wasser-Emulsion mit einem Tensid als Emulsions-Stabilisator (A) und der *Pickering*-Emulsion mit Nanopartikeln als Emulsions-Stabilisator (B).

Für die Synthese der Mikrokompositpartikel im Industriemaßstab sollte daher auf Basis der *Pickering*-Emulsionstechnik eine Alternative zu Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen, die mit PVA stabilisiert wurden, erarbeitet werden. Dabei sollten Hydroxylapatit-Nanopartikel die Emulsion stabilisieren, so dass auf Polyvinylalkohol (PVA) als Emulsions-Stabilisator verzichtet werden kann. Wird hierbei die passende Konzentration an Hydroxylapatit-Nanopartikeln gewählt, so dass diese die Emulsion hinreichend stabilisieren, aber die Rieselfähigkeit des resultierenden Kompositpulvers durch zu viele überschüssige Nanopartikel nicht beeinträchtigen, so sind die Aufreinigungsschritte (mehrfaches Sedimentieren und Abdekantieren) nicht mehr notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine mögliche Syntheseroute für die Herstellung der Mikrokompositpartikel mittels *Pickering*-Emulsionen entwickelt und die optimale Hydroxylapatit-Nanopartikel Konzentration in der wässrigen Phase zur Emulsionsstabilisierung ermittelt.

Dazu wurden zunächst Hydroxylapatit-Nanopartikel in der kontinuierlichen wässrigen Phase dispergiert (0,04 Gew.-% bis 0,15 Gew.-% bezogen auf die kontinuierliche wässrige Phase). Nach Zugabe der organischen Phase (LR704S gelöst in Dichlormethan), in der zusätzlich 25 Gew.-% Calcit-Nanopartikel (bezogen auf LR704S) dispergiert waren, erfolgte die Emulgation durch kräftiges Schütteln. Die daraus resultierende S/O/W-Emulsion wurde anschließend für 72 h gerührt, bis das organische Lösemittel (Dichlormethan) vollständig verdampft war. Dabei fiel das Polymer aus und schloss die Keramik-Partikel in der Polymermatrix ein.

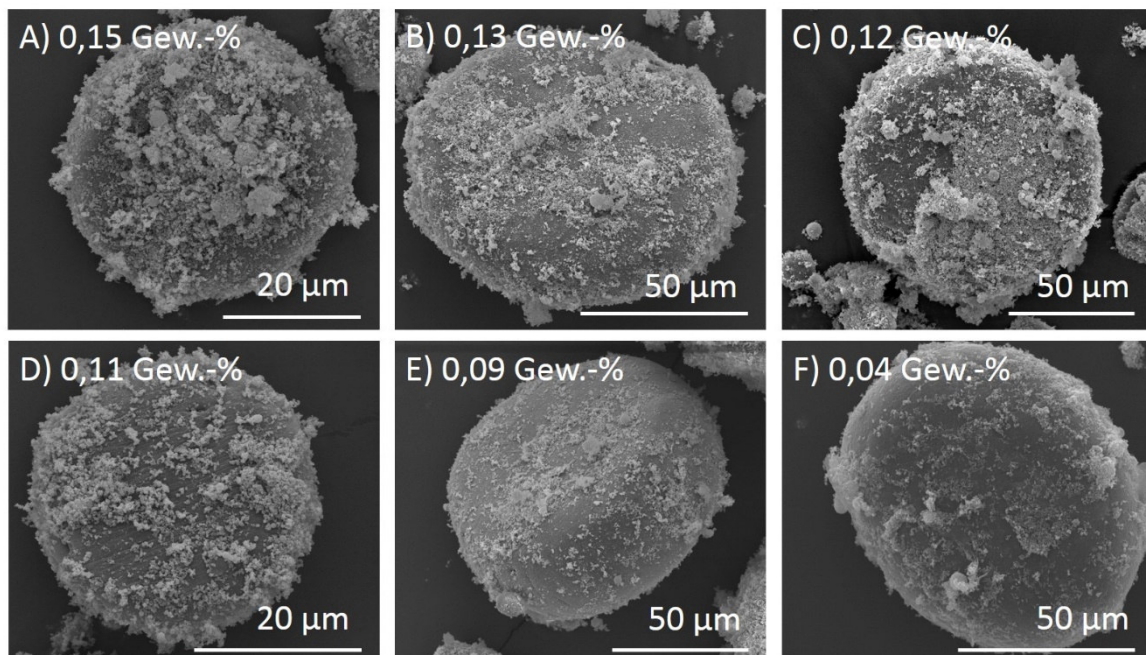


Abbildung 71: Rasterelektronenmikroskopische Nahaufnahme der mittels *Pickering*-Emulsion hergestellten LR704S-Mikrokompositpartikel. Hydroxylapatit-Nanopartikel dienten in unterschiedlichen Konzentrationen (von 0,15 Gew.-% bis 0,04 Gew.-%, A-F) als Emulsions-Stabilisator.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 71) der mittels *Pickering*-Emulsionen hergestellten Mikrokompositpartikel zeigen kugelförmige Partikel im Größenbereich von ca. 20-60 μm . Übersichtsaufnahmen zeigen Partikel im Größenbereich von ca. 10-100 μm mit einem Verteilungsmaximum (siehe Abbildung 72) bei ca. 20 μm für alle getesteten Hydroxylapatit-Nanopartikel-Konzentrationen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Hydroxylapatit-Nanopartikel an der Oberfläche der Mikrokompositpartikel adsorbiert sind und abhängig von der verwendeten Hydroxylapatit-Nanopartikelkonzentration die Oberfläche der Mikrokompositpartikel stark (0,15 Gew.-%), oder weniger stark (0,04 Gew.-%) bedecken.

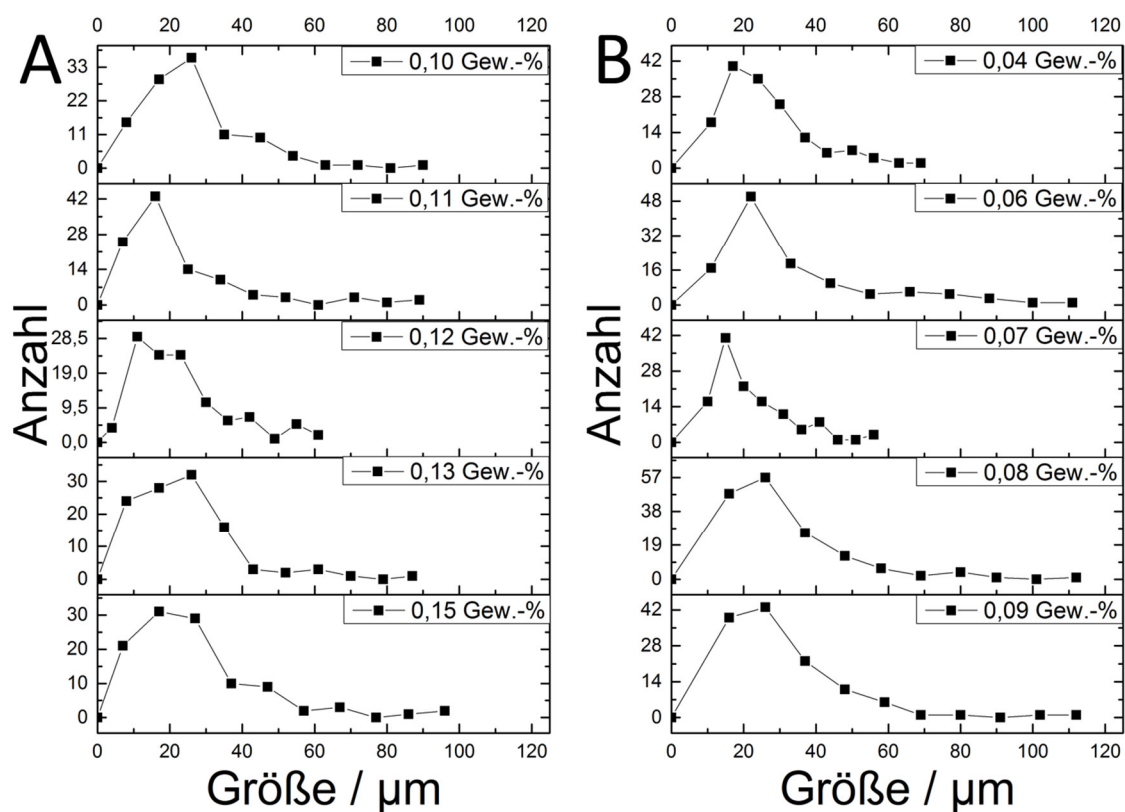


Abbildung 72: Mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmte Größenverteilung der mittels *Pickering*-Emulsion hergestellten LR704S-Mikrokompositpartikel. Vor der Größenbestimmung wurde das Pulver getrocknet und gemörsert. Hydroxylapatit-Nanopartikel dienten in unterschiedlichen Konzentrationen als Emulsions-Stabilisator.

Es ist jedoch kein Zusammenhang zwischen der Nanopartikelkonzentration und der Emulsionsstabilität bzw. Partikelgrößenverteilung zu erkennen. Im Vergleich zu Emulsionen, die mit PVA stabilisiert wurden, waren die *Pickering*-Emulsionen relativ instabil und zeigten moderate Ausbeuteverluste (ausgefallenes Polymer am Becherglasrand und am Magnetrührstäbchen). Die Ausbeute betrug ca. 30 % des eingesetzten Polymers.

5.3.8 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die Synthese von Polylactid-Keramik-Mikrokompositpartikeln mit einer homogenen Keramikverteilung und einem gesamten Keramikanteil von 50 Gew.-% über eine Feststoff-in-Öl-in-Wasser Emulsionstechnik realisiert. Hierbei wurde zunächst der Einfluss verschiedener Calciumphosphate und Calciumcarbonate auf die Partikelmorphologie sowie die Fließfähigkeit und Verarbeitbarkeit im selektiven Lasersinterprozess der resultierenden Mikrokompositpartikel untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Keramik-Mikropartikel nur oberflächlich an die Mikrokompositpartikel adsorbierten. Nicht eingebaute Keramikpartikel ließen sich nicht durch die Aufreinigung mittels Sedimentieren und Abdekantieren abtrennen und beeinflussten die Fließfähigkeit des Pulvers negativ. Keramik-Nanopartikel wurden hingegen homogen an der Oberfläche der Polymermatrix adsorbiert. Überschüssige Nanopartikel konnten vollständig mittels Sedimentieren und Abdekantieren entfernt werden, so dass ein rieselfähiges Pulver in einem Größenbereich von 10 bis ca. 70 μm entstand. Aus den Mikrokompositpartikeln wurden anschließend Werkstücke mittels Heißpress-Verfahren gefertigt und die mechanischen Eigenschaften in Dreipunktbiegeversuchen untersucht und mit Literaturdaten menschlicher Knochen verglichen. Durch den Zusatz von Hydroxylapatit und Calciumcarbonat konnten die *E*-Moduln um den Faktor sechs bis acht im Vergleich zum reinen Polymer erhöht werden. Die *E*-Moduln der Komposit-Werkstücke liegen mit Werten von 7-8 GPa im unteren Größenbereich von kompakten Knochen (5-21 GPa) und im gleichen Größenbereich wie der Durchschnittswert der gesamten Knochen ($10,3 \pm 5,7$ GPa). Auch die Proliferation von Osteoblasten auf der Oberfläche von Presslingen konnte durch den Zusatz von Hydroxylapatit- und Calcit-Nanopartikeln ca. um den Faktor 20 im Vergleich zu reinem Polymer erhöht werden. Degradationsuntersuchungen zeigten, dass das Polylactid durch Hydrolyse in

saure Degradationsprodukte abgebaut wurde. Der pH-Wert von Werkstücken, die nur aus Polylactid gefertigt wurden, sank auf $\text{pH} = 2,3$. Durch den Zusatz von Calciumcarbonat konnte die saure Degradation jedoch erfolgreich abgepuffert werden. Der pH-Wert von Polylactid-Calciumcarbonat-Werkstücken lag nach 32 Tagen beschleunigter Degradation bei $\text{pH} = 6,9$.

Als alternativer Herstellungsprozess wurde des Weiteren versucht, die Mikrokompositpartikel über *Pickering*-Emulsionen, bei denen Hydroxylapatit-Nanopartikel als Emulsionsstabilisator dienten, zu synthetisieren und somit eine tensidfreie Synthese zu entwickeln. Die resultierenden Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen waren hingegen im Vergleich zu Emulsionen, die mit Polyvinylalkohol stabilisiert wurden, instabil. Daraus resultierten Ausbeuteverluste von ca. 70 % durch Polymer, welches am Becherglasrand ausfiel. Die resultierenden Mikrokompositpartikel waren kugelförmig und lagen im Größenbereich von 10-100 μm mit einer homogenen Keramikverteilung vor.

Es konnte somit gezeigt werden, dass über die Syntheseroute der S/O/W-Emulsion Polylactid-Keramik-Mikrokompositpartikel mit hohem Keramikanteil zugänglich sind. Heißgepresste Werkstücke der Polylactid-Keramik-Mikrokompositpartikel zeigten zudem vielversprechende mechanische und zellbiologische Eigenschaften, die einen Einsatz als Knochenersatzmaterial ermöglichen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz von Kompositmaterialien aus Calciumphosphat und biodegradierbaren Polymeren auf der Basis von Polylactid für den Wirkstofftransport und Knochenersatz untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel als Wirkstoffträgersystem für anionische, hydrophile Wirkstoffe wie Proteine und Nukleinsäuren entwickelt. Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechniken erwiesen sich hierbei als optimale Syntheserouten und lieferten Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel mit einem Kerndurchmesser von ca. 100 nm. Dabei zeigte sich, dass durch den Zusatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln die Verkapselungseffizienz von PLGA-Nanopartikeln für Proteine und Nukleinsäuren um den Faktor drei bis zehn gegenüber reinen PLGA-Nanopartikeln erhöht werden konnte. Durch *Layer-by-Layer* Verfahren konnten die Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel des Weiteren mit den polykationischen Polymeren Chitosan und Polyethylenimin beschichtet werden. In Zellaufnahmestudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie zeigte sich, dass die kationischen Nanopartikel deutlich besser von HeLa-Zellen aufgenommen werden und zudem in der Lage sind, den endosomalen und lysosomalen Kompartimenten zu entkommen. Auch die Genstummschaltungseffizienz konnte durch die Beschichtung mit Chitosan und Polyethylenimin im Vergleich zu anionischen Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikeln gesteigert werden. Als Vorteil gegenüber ein- oder mehrschaligen Calciumphosphat-Nanopartikeln stellte sich die gute Lagerstabilität der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel ohne den Einsatz von Kryoprotektoren heraus. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde schließlich ein kontinuierlicher Syntheseprozess entwickelt, der eine kontaktfreie und sterile Arbeitsweise erlaubt. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung dieser Nanopartikel in der pharmazeutischen Industrie war dies ein wichtiger Entwicklungsschritt. In zukünftigen Arbeiten müssen hingegen weiterführende zellbiologische Untersuchungen bezüglich der Effektivität der Calciumphosphat-PLGA-Nanopartikel mit therapeutisch wirksamen Nukleinsäuresequenzen und Proteinen durchgeführt werden. Diese Studien sollten die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten prinzipiellen Machbarkeitsstudien erweitern.

Als Alternative zur PLGA-Matrix wurde im weiteren Verlauf der Arbeit das Pharma-Polymer Eudragit®-E100 verwendet. Die Synthese mittels Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen ließ sich auf die Herstellung von Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel übertragen und lieferte Nanopartikel mit einem Kerndurchmesser von 130 nm und einer stark positiv geladenen Partikeloberfläche. Es konnte zudem gezeigt werden, dass während der Synthese sowohl hydrophile als auch hydrophobe Modellwirkstoffe verkapselt werden können und die Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel ein vielfältiges Trägersystem darstellen. In Zellaufnahmestudien und Genstummschaltungsexperimenten konnte zudem die biologische Wirksamkeit und Verträglichkeit gezeigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Polylactid-Keramik-Mikrokompositpartikel für die generative Fertigung von Knochenersatzmaterialien entwickelt. Eine besondere Herausforderung war hierbei, Mikrokompositpartikel mit einem hohen Keramikanteil und einer homogenen Keramikverteilung innerhalb der Partikel zu synthetisieren, die zudem die sauren Degradationsprodukte des Polylactids abpuffern und sich für die Verwendung im selektiven Lasersinterprozess eignen. Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Emulsionstechniken erwiesen sich hierbei als optimale Syntheseroute und lieferten Mikrokompositpartikel im Größenbereich von ca. 10-70 µm. Eine wichtige Erkenntnis bei der Synthese der Mikrokompositpartikel war die Beobachtung, dass Calciumphosphat- und Calciumcarbonat-Mikropartikel eine geringe Affinität zur Polymermatrix aufwiesen, während Calciumphosphat- und Calciumcarbonat-Nanopartikel sehr homogen in die Polymermatrix eingebettet wurden. Durch Heißpressverfahren wurden die Mikrokompositpartikel zudem zu Werkstücken verarbeitet und hinsichtlich ihrer mechanischen Eignung als Knochenersatzmaterial geprüft. Die *E*-Moduln der Werkstücke bestehend aus LR704S-Mikrokompositen lagen dabei im Größenbereich von kompaktem Knochen und waren um den Faktor sechs bis acht größer als bei Werkstücken, die aus reinen Polymer-Mikropartikeln gefertigt wurden. Auch die Proliferation von Osteoblasten auf der Oberfläche von Presslingen wurde durch den Zusatz von Calciumphosphat- und Calciumcarbonat-Nanopartikeln im Vergleich zu reinen Polymer-Presslingen gesteigert. Degradationsuntersuchungen zeigten abschließend, dass Calciumcarbonat die saure Degradation des Polylactids abpuffert. In weiteren Studien müssen ausgehend

von den optimierten intrinsischen Eigenschaften der Polylactid-Keramik-Mikrokompositpartikel und der resultierenden Werkstücke die mechanische Langzeitstabilität und das *in vivo*-Verhalten im Tierversuch untersucht werden.

Als alternativer Herstellungsprozess wurde des Weiteren versucht, die Mikrokompositpartikel über *Pickering*-Emulsionen, bei denen Hydroxylapatit-Nanopartikel als Emulsionsstabilisator dienten, zu synthetisieren und somit eine tensidfreie Synthese zu entwickeln, die keine Aufreinigungsschritte benötigt. Die resultierenden Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen waren jedoch im Vergleich zu Emulsionen, die mit Polyvinylalkohol stabilisiert wurden, instabil.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in der vorliegenden Arbeit Kompositmaterialien auf der Grundlage von Calciumphosphat und biodegradierbaren Polymeren sowohl für den Wirkstofftransport in der Nanomedizin als auch für die generative Fertigung von Knochenersatzmaterialien erfolgreich entwickelt werden konnten.

7. Literaturverzeichnis

- [1] M. Ferrari, *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5, 161-171.
- [2] L. Zhai, F. C. Cebeci, R. E. Cohen, M. F. Rubner, *Nano Lett.*, **2004**, 4, 1349-1353.
- [3] Z.-Z. Gu, H. Uetsuka, K. Takahashi, R. Nakajima, H. Onishi, A. Fujishima, O. Sato, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 894-897.
- [4] A. Becheri, M. Duerr, P. Lo Nostro, P. Baglioni, *J. Nanopart. Res.*, **2008**, 10, 679-689.
- [5] M. R. Wiesner, G. V. Lowry, P. Alvarez, D. Dionysiou, P. Biswas, *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 40, 4336-4345.
- [6] C. M. Wiethoff, C. R. Middaugh, *J. Pharm. Sci.*, **2003**, 92, 203-217.
- [7] J. K. Vasir, V. Labhasetwar, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2007**, 59, 718-728.
- [8] H. Hillaireau, P. Couvreur, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2009**, 66, 2873-2896.
- [9] R. Duncan, *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, 6, 688-701.
- [10] L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R. S. Langer, O. C. Farokhzad, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2008**, 83, 761-769.
- [11] O. A. Trentz, R. Zellweger, M. G. Amgwerd, G. K. Uhlschmid, *Unfallchirurg*, **1997**, 100, 39-43.
- [12] S. Weiner, H. D. Wagner, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **1998**, 28, 271-298.
- [13] J. D. Currey, *J. Mater. Sci.*, **2012**, 47, 41-54.
- [14] M. Vallet-Regi, M. Colilla, B. Gonzalez, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 596-607.
- [15] M. Gurr, R. Mülhaupt, *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, Amsterdam, **2012**.
- [16] B. Duan, M. Wang, W. Y. Zhou, W. L. Cheung, Z. Y. Li, W. W. Lu, *Acta Biomater.*, **2010**, 6, 4495-4505.
- [17] C. R. Deckard, *U.S. Patent 4863538*, **1986**.
- [18] E. N. Antonov, V. N. Bagratashvili, M. J. Whitaker, J. J. A. Barry, K. M. Shakesheff, A. N. Konovalov, V. K. Popov, S. M. Howdle, *Adv. Mater.*, **2005**, 17, 327-330.
- [19] D. W. Hutmacher, *Biomaterials*, **2000**, 21, 2529-2543.

- [20] R. J. Kroeze, M. N. Helder, L. E. Govaert, T. H. Smit, *Materials*, **2009**, *2*, 833-856.
- [21] C. Martin, H. Winet, J. Y. Bao, *Biomaterials*, **1996**, *17*, 2373-2380.
- [22] F. von Burkersroda, L. Schedl, A. Gopferich, *Biomaterials*, **2002**, *23*, 4221-4231.
- [23] C. Schiller, C. Rasche, M. Wehmöller, F. Beckmann, H. Eufinger, M. Eppe, S. Weihe, *Biomaterials*, **2003**, *25*, 1239-1247.
- [24] C. Schiller, M. Eppe, *Biomaterials*, **2003**, *24*, 2037-2043.
- [25] H. Eufinger, C. Rasche, J. Lehmbruck, M. Wehmöller, S. Weihe, I. Schmitz, C. Schiller, M. Eppe, *Biomaterials*, **2007**, *28*, 475-485.
- [26] C. P. Bergmann, A. Stumpf, *Dental Ceramics, Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2013**.
- [27] M. Eppe, *Biomaterialien und Biomineralisation*, Teubner Verlag, Wiesbaden, **2003**.
- [28] E. Wintermantel, S.-W. Ha, *Medizintechnik, Life Science, Engineering*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2009**.
- [29] C. Rentsch, B. Rentsch, D. Scharnweber, H. Zwipp, S. Rammelt, *Unfallchirurg*, **2012**, *115*, 938-949.
- [30] M. Wehmöller, K. Neuking, M. Eppe, T. Annen, H. Eufinger, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.*, **2006**, *37*, 413-415.
- [31] W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, A. F. Schilling, M. Amling, J. M. Rüger, M. Eppe, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, *54*, 162-171.
- [32] S. Backhaus, T. Annen, M. Eppe, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.*, **2013**, *44*, 107-111.
- [33] W. Y. Zhou, S. H. Lee, M. Wang, W. L. Cheung, W. Y. Ip, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2008**, *19*, 2535-2540.
- [34] F. E. Wiria, K. F. Leong, C. K. Chua, Y. Liu, *Acta Biomater.*, **2007**, *3*, 1-12.
- [35] R. L. Simpson, F. E. Wiria, A. A. Amis, C. K. Chua, K. F. Leong, U. N. Hansen, M. Chandrasekaran, M. W. Lee, *J. Biomed. Mater. Res. B*, **2008**, *84*, 17-25.
- [36] S. Eosoly, D. Brabazon, S. Lohfeld, L. Looney, *Acta. Biomater.*, **2010**, *6*, 2511-2517.
- [37] D. K. Gilding, A. M. Reed, *Polymer*, **1979**, *20*, 1459-1464.

- [38] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, *Prog. Polym. Sci.*, **2012**, *37*, 237-280.
- [39] A.-C. Albertsson, I. K. Varma, *Adv. Polym. Sci.*, **2002**, *157*, 1-40.
- [40] H. Seyednejad, A. H. Ghassemi, C. F. van Nostrum, T. Vermonden, W. E. Hennink, *J. Control. Release*, **2011**, *152*, 168-176.
- [41] A. P. Gupta, V. Kumar, *Eur. Polym. J.*, **2007**, *43*, 4053-4074.
- [42] R. H. Platel, L. M. Hodgson, C. K. Williams, *Polym. Rev.*, **2008**, *48*, 11-63.
- [43] D. Voet, J. G. Voet, *Lehrbuch der Biochemie*, WILEY-VCH, Weinheim, **2002**.
- [44] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organische Chemie*, WILEY-VCH, Weinheim, **2005**.
- [45] W. Linhart, W. Lehmann, M. Siedler, F. Peters, A. F. Schilling, K. Schwarz, M. Amling, J. M. Rüger, M. Eppler, *J. Mater. Sci.*, **2006**, *41*, 4806-4813.
- [46] M. Neumann, M. Eppler, *Eur. J. Trauma*, **2006**, *2006*, 125-131.
- [47] A. Giteau, M. C. Venier-Julienne, A. Aubert-Pouessel, J. P. Benoit, *Int. J. Pharm.*, **2008**, *350*, 14-26.
- [48] V. Uskokovic, C. Hoover, M. Vukomanovic, D. P. Uskokovic, T. A. Desai, *Mater. Sci. Eng.*, **2013**, *33*, 3362-3373.
- [49] H. K. Makadia, S. J. Siegel, *Polymers*, **2011**, *3*, 1377-1397.
- [50] N. L. Ignjatovic, P. Ninkov, R. Sabetrasekh, D. P. Uskokovic, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2010**, *21*, 231-239.
- [51] N. L. Ignjatovic, C. Z. Liu, J. T. Czernuszka, D. P. Uskokovic, *Acta Biomater.*, **2007**, *3*, 927-935.
- [52] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, B. A. Le, V. Preat, *J. Control. Release*, **2012**, *161*, 505-522.
- [53] S. V. Dorozhkin, M. Eppler, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 3130-3146.
- [54] J. Enax, O. Prymak, D. Raabe, M. Eppler, *J. Struct. Biol.*, **2012**, *178*, 290-299.
- [55] D. Tadic, M. Eppler, *Biomaterials*, **2003**, *25*, 987-994.
- [56] D. Tadic, F. Peters, M. Eppler, *Biomaterials*, **2002**, *23*, 2553-2559.
- [57] V. Sokolova, D. Kozlova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Eppler, *Acta Biomater.*, **2013**, *9*, 7527-7535.
- [58] I. Roy, S. Mitra, A. Maitra, S. Mozumdar, *Int. J. Pharm.*, **2003**, *250*, 25-33.

- [59] T. T. Morgan, H. S. Muddana, E. I. Altinoglu, S. M. Rouse, A. Tabakovic, T. Tabouillot, T. J. Russin, S. S. Shanmugavelandy, P. J. Butler, P. C. Eklund, J. K. Yun, M. Kester, J. H. Adair, *Nano Lett.*, **2008**, 8, 4108-4115.
- [60] S. Bisht, G. Bhakta, S. Mitra, A. Maitra, *Int. J. Pharm.*, **2005**, 288, 157-168.
- [61] E. I. Altinoglu, T. J. Russin, J. M. Kaiser, B. M. Barth, P. C. Eklund, M. Kester, J. H. Adair, *ACS Nano*, **2008**, 2, 2075-2084.
- [62] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 1382-1395.
- [63] J. Schwiertz, A. Wiehe, S. Graefe, B. Gitter, M. Epple, *Biomaterials*, **2009**, 30, 3324-3331.
- [64] J. Klesing, A. Wiehe, B. Gitter, S. Graefe, M. Epple, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2010**, 21, 887-892.
- [65] V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Epple, *Biomaterials*, **2006**, 27, 3147-3153.
- [66] V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Sci.*, **2010**, 45, 4952-4957.
- [67] S. Neumann, A. Kovtun, I. D. Dietzel, M. Epple, R. Heumann, *Biomaterials*, **2009**, 30, 6794-6802.
- [68] J. Klesing, S. Chernousova, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 22, 199-204.
- [69] D. Kozlova, V. Sokolova, M. Zhong, E. Zhang, J. Yang, W. Li, Y. Yang, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, H. Yan, *Viol. Sin.*, **2014**, 29, 33-39.
- [70] F. L. Graham, A. J. van der Eb, *Virology*, **1973**, 52, 456-467.
- [71] C. A. Chen, H. Okayama, *Mol. Cell. Biol.*, **1987**, 7, 2745-2752.
- [72] C. A. Chen, H. Okayama, *Biotechniques*, **1988**, 6, 632-634, 636-638.
- [73] H. Luthman, G. Magnusson, *Nucleic Acids Res.*, **1983**, 11, 1295-1308.
- [74] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2002**.
- [75] T. Hofmann, *Chem. unserer Zeit*, **2004**, 38, 24-35.
- [76] Malvern-Instruments, *Zetasizer nanoseries, user manual*, **2003**.
- [77] D. H. Everett, *Basic Principles of Colloid Science*, The Royal Society of Chemistry, **1988**.
- [78] J. Wang, B. Chen, D. Zhao, Y. Peng, R.-X. Zhuo, S.-X. Cheng, *Int. J. Pharm.*, **2013**, 446, 205-210.

- [79] K. Lee, M. H. Oh, M. S. Lee, Y. S. Nam, T. G. Park, J. H. Jeong, *Int. J. Pharm.*, **2013**, *445*, 196-202.
- [80] V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E. A. Kubareva, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 721-727.
- [81] A. Peetsch, *Dissertation, Universität Duisburg-Essen*, **2013**.
- [82] A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.*, **2009**, *8*, 543-557.
- [83] I. Canton, G. Battaglia, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2718-2739.
- [84] G. Sahay, D. Y. Alakhova, A. V. Kabanov, *J. Control. Release*, **2010**, *145*, 182-195.
- [85] G. J. Doherty, H. T. McMahon, *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, *78*, 857-902.
- [86] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature*, **2003**, *422*, 37-44.
- [87] J. Panyam, V. Labhasetwar, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2003**, *55*, 329-347.
- [88] A. Nan, X. Bai, S. J. Son, S. B. Lee, H. Ghandehari, *Nano Lett.*, **2008**, *8*, 2150-2154.
- [89] Z. Ma, L.-Y. Lim, *Pharm. Res.*, **2003**, *20*, 1812-1819.
- [90] T. J. Pucadyil, S. L. Schmid, *Science*, **2009**, *325*, 1217-1220.
- [91] V. I. Slepnev, P. De Camilli, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2000**, *1*, 161-172.
- [92] J. Rejman, M. Conese, D. Hoekstra, *J. Liposome Res.*, **2006**, *16*, 237-247.
- [93] R. G. Parton, K. Simons, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, *8*, 185-194.
- [94] L. A. Carver, J. E. Schnitzer, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 571-581.
- [95] J. Mercer, A. Helenius, *Nat. Cell Biol.*, **2009**, *11*, 510-520.
- [96] M. C. Kerr, R. D. Teasdale, *Traffic*, **2009**, *10*, 364-371.
- [97] A. T. Jones, *J. Cell. Mol. Med.*, **2007**, *11*, 670-684.
- [98] Y.-Y. Won, R. Sharma, S. F. Konieczny, *J. Control. Release*, **2009**, *139*, 88-93.
- [99] M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, *J. Gene Med.*, **2005**, *7*, 992-1009.
- [100] S. E. McNeil, Y. Perrie, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2006**, *16*, 1371-1382.
- [101] C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E. M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Koteliansky, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nat. Biotechnol.*, **2007**, *25*, 1149-1157.
- [102] J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes, J. L. S. Au, *AAPS J.*, **2010**, *12*, 492-503.

- [103] C. X. Li, A. Parker, E. Menocal, S. Xiang, L. Borodyansky, J. H. Fruehauf, *Cell Cycle*, **2006**, 5, 2103-2109.
- [104] M. A. Kutzler, D. B. Weiner, *Nat. Rev. Genet.*, **2008**, 9, 776-788.
- [105] J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 1378-1398.
- [106] D. Reischl, A. Zimmer, *Nanomedicine*, **2009**, 5, 8-20.
- [107] C. Raoul, S. D. Barker, P. Aebischer, *Gene Ther.*, **2006**, 13, 487-495.
- [108] H. Xia, Q. Mao, H. L. Paulson, B. L. Davidson, *Nat. Biotechnol.*, **2002**, 20, 1006-1010.
- [109] L. M. Kasman, S. Barua, P. Lu, K. Rege, C. Voelkel-Johnson, *Mol. Pharmaceut.*, **2009**, 6, 1612-1619.
- [110] T. R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami, *Cancer Cell*, **2002**, 2, 243-247.
- [111] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.-P. Elsasser, T. Kissel, *Pharm. Res.*, **1999**, 16, 1273-1279.
- [112] A. K. Salem, P. C. Searson, K. W. Leong, *Nat. Mater.*, **2003**, 2, 668-671.
- [113] M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, J.-P. Benoit, *Biomaterials*, **2008**, 29, 3477-3496.
- [114] H. Aihara, J.-i. Miyazaki, *Nat. Biotechnol.*, **1998**, 16, 867-870.
- [115] J. Gehl, *Acta Physiol. Scand.*, **2003**, 177, 437-447.
- [116] C. C. Mello, J. M. Kramer, D. Stinchcomb, V. Ambros, *EMBO J.*, **1991**, 10, 3959-3970.
- [117] A. Porgador, K. R. Irvine, A. Iwasaki, B. H. Barber, N. P. Restifo, R. N. Germain, *J. Exp. Med.*, **1998**, 188, 1075-1082.
- [118] A. L. Rakhmievich, J. Turner, M. J. Ford, D. McCabe, W. H. Sun, P. M. Sondel, K. Grotz, N.-S. Yang, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 6291-6296.
- [119] Y. Xu, F. C. Szoka, *Biochemistry*, **1996**, 35, 5616-5623.
- [120] C. P. Paul, P. D. Good, I. Winer, D. R. Engelke, *Nat. Biotechnol.*, **2002**, 20, 505-508.
- [121] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, P. S. Stayton, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2005**, 4, 581-593.
- [122] A. Paul, C.-J. Eun, J. M. Song, *Polymer*, **2014**.
- [123] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, V. M. Rotello, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2008**, 60, 1307-1315.

- [124] P. K. Brown, A. T. Qureshi, A. N. Moll, D. J. Hayes, W. T. Monroe, *ACS Nano*, **2013**, 7, 2948-2959.
- [125] K. Amarnath, J. Kumar, T. Reddy, V. Mahesh, S. R. Ayyappan, J. Nellore, *Colloids Surface B*, **2013**, 111, 769.
- [126] E. B. Caruso, S. Petralia, S. Conoci, S. Giuffrida, S. Sortino, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 480-481.
- [127] A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials*, **2005**, 26, 3995-4021.
- [128] L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas, J. L. West, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 13549-13554.
- [129] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V. S. Y. Lin, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2008**, 60, 1278-1288.
- [130] G. Dördelmann, H. Pfeiffer, A. Birkner, U. Schatzschneider, *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 4362-4367.
- [131] J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Eppele, *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 6144-6148.
- [132] J. Klesing, *Dissertation, Universität Duisburg-Essen*, **2012**.
- [133] Y. Xie, H. Qiao, Z. Su, M. Chen, Q. Ping, M. Sun, *Biomaterials*, **2014**, 35, 7978-7991.
- [134] D. A. Dean, *Exp. Cell Res.*, **1997**, 230, 293-302.
- [135] W.-C. Tseng, F. R. Haselton, T. D. Giorgio, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1445, 53-64.
- [136] I. Mortimer, P. Tam, I. MacLachlan, R. W. Graham, E. G. Saravolac, P. B. Joshi, *Gene Ther.*, **1999**, 6, 403-411.
- [137] A. Fasbender, J. Zabner, B. G. Zeiher, M. J. Welsh, *Gene Ther.*, **1997**, 4, 1173-1180.
- [138] S. Brunner, T. Sauer, S. Carotta, M. Cotten, M. Saltik, E. Wagner, *Gene Ther.*, **2000**, 7, 401-407.
- [139] Z. Yang, G. Sahay, S. Sriadibhatla, A. V. Kabanov, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 1987-1994.
- [140] A. M. Miller, D. A. Dean, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2009**, 61, 603-613.
- [141] Z. Z. Gaymalov, Z. Yang, V. M. Pisarev, V. Y. Alakhov, A. V. Kabanov, *Biomaterials*, **2009**, 30, 1232-1245.

- [142] M. Wilke, E. Fortunati, M. van den Broek, A. T. Hoogeveen, B. J. Scholte, *Gene Ther.*, **1996**, 3, 1133-1142.
- [143] H. Pollard, J.-S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J.-P. Behr, D. Escande, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 7507-7511.
- [144] M. B. James, T. D. Giorgio, *Mol. Ther.*, **2000**, 1, 339-346.
- [145] R. Tachibana, H. Harashima, N. Ide, S. Ukitsu, Y. Ohta, N. Suzuki, H. Kikuchi, Y. Shinohara, H. Kiwada, *Pharm. Res.*, **2002**, 19, 377-381.
- [146] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature*, **1998**, 391, 806-811.
- [147] S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.*, **2001**, 15, 188-200.
- [148] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature*, **2001**, 411, 494-498.
- [149] G. Hutvagner, P. D. Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2002**, 12, 225-232.
- [150] S. M. Hammond, *FEBS Lett.*, **2005**, 579, 5822-5829.
- [151] R. E. Collins, X. Cheng, *FEBS Lett.*, **2005**, 579, 5841-5849.
- [152] M. J. Clemens, A. Elia, *J. Interf. Cytok. Res.*, **1997**, 17, 503-524.
- [153] M. R. Player, P. F. Torrence, *Pharmacol Ther.*, **1998**, 78, 55-113.
- [154] J. B. Preall, E. J. Sontheimer, *Cell*, **2005**, 123, 543-545.
- [155] K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2009**, 8, 129-138.
- [156] C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, P. D. Zamore, *Cell*, **2005**, 123, 607-620.
- [157] J. Liu, M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J.-J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, G. J. Hannon, *Science*, **2004**, 305, 1437-1441.
- [158] M. Tijsterman, R. H. A. Plasterk, *Cell*, **2004**, 117, 1-4.
- [159] G. Meister, T. Tuschl, *Nature*, **2004**, 431, 343-349.
- [160] D. Felsenberg, *Pharm. unserer Zeit*, **2001**, 30, 488-494.
- [161] M. J. Berridge, *Cell Signalling Biology*, **2012**.
- [162] J.-Y. Rho, T. Y. Tsui, G. M. Pharr, *Biomaterials*, **1997**, 18, 1325-1330.
- [163] P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschalis, P. Roschger, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2115-2123.
- [164] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, *Med. Eng. Phys.*, **1998**, 20, 92-102.

- [165] W. J. Boyle, W. S. Simonet, D. L. Lacey, *Nature*, **2003**, 423, 337-342.
- [166] B. Alberts, *Molecular Biology of The Cell*, Garland Science, New York, **2008**.
- [167] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme-Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [168] J. Tang, J.-Y. Chen, J. Liu, M. Luo, Y.-J. Wang, X.-w. Wei, X. Gao, B.-l. Wang, Y.-B. Liu, T. Yi, A.-P. Tong, X.-R. Song, Y.-M. Xie, Y. Zhao, M. Xiang, Y. Huang, Y. Zheng, *Int. J. Pharm.*, **2012**, 431, 210-221.
- [169] C. Perez, A. Sanchez, D. Putnam, D. Ting, R. Langer, M. J. Alonso, *J. Control. Release*, **2001**, 75, 211-224.
- [170] K. Landfester, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 4488-4507.
- [171] G. Decher, *Science*, **1997**, 277, 1232-1237.
- [172] S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer, R. H. Stauber, *Nat. Nanotechnol.*, **2013**, 8, 772-781.
- [173] G. Dördelmann, D. Kozlova, M. Epple, *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 7123-7131.
- [174] G. Dördelmann, D. Kozlova, S. Karczewski, R. Lizio, S. Knauer, M. Epple, *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 7250-7259.
- [175] D. Gerlier, N. Thomasset, *J. Immunol. Methods*, **1986**, 94, 57-63.
- [176] F. Danhier, N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jerome, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, V. Preat, *J. Control. Release*, **2009**, 133, 11-17.
- [177] A. Sarkar, S. Mahapatra, *Cryst. Growth Des.*, **2010**, 10, 2129-2135.
- [178] A. Schussele, A. Bauer-Brandl, *Int. J. Pharm.*, **2003**, 257, 301-304.
- [179] C. Vauthier, K. Bouchemal, *Pharm. Res.*, **2009**, 26, 1025-1058.
- [180] C. Wischke, S. P. Schwendeman, *Int. J. Pharm.*, **2008**, 364, 298-327.
- [181] D. Cun, D. K. Jensen, M. J. Maltesen, M. Bunker, P. Whiteside, D. Scurr, C. Foged, H. M. Nielsen, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2011**, 77, 26-35.
- [182] A. Hamberger, U. Ziener, K. Landfester, *Macromol. Chem. Phys.*, **2013**, 214, 691-699.
- [183] N. Nabih, K. Landfester, A. Taden, *J. Polym. Sci. Part A*, **2011**, 49, 5019-5029.

- [184] K. Sandvig, S. Pust, T. Skotland, B. van Deurs, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2011**, 23, 413-420.
- [185] L. Johannes, C. Lamaze, *Traffic*, **2002**, 3, 443-451.
- [186] V. Cavalli, M. Corti, J. Gruenberg, *FEBS Lett.*, **2001**, 498, 190-196.
- [187] A. F. Adler, K. W. Leong, *Nano Today*, **2010**, 5, 553-569.
- [188] M. Okada, H. Maeda, S. Fujii, Y. Nakamura, T. Furuzono, *Langmuir*, **2012**, 28, 9405-9412.
- [189] H. Maeda, M. Okada, S. Fujii, Y. Nakamura, T. Furuzono, *Langmuir*, **2010**, 26, 13727-13731.
- [190] S. Fujii, M. Okada, H. Sawa, T. Furuzono, Y. Nakamura, *Langmuir*, **2009**, 25, 9759-9766.
- [191] Y. Chevalier, M.-A. Bolzinger, *Colloids Surf. A*, **2013**, 439, 23-34.
- [192] Y. B. Patil, S. K. Swaminathan, T. Sadhukha, L. Ma, J. Panyam, *Biomaterials*, **2010**, 31, 358-365.
- [193] S. K. Samal, M. Dash, V. S. Van, D. L. Kaplan, E. Chiellini, B. C. van, L. Moroni, P. Dubruel, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 7147-7194.
- [194] C. G. Oster, N. Kim, L. Grode, L. Barbu-Tudoran, A. K. Schaper, S. H. E. Kaufmann, T. Kissel, *J. Control. Release*, **2005**, 104, 359-377.
- [195] J. Panyam, V. Labhasetwar, *Pharm. Res.*, **2003**, 20, 212-220.
- [196] M. G. Qaddoumi, H. Ueda, J. Yang, J. Davda, V. Labhasetwar, V. H. L. Lee, *Pharm. Res.*, **2004**, 21, 641-648.
- [197] J. K. Vasir, V. Labhasetwar, *Biomaterials*, **2008**, 29, 4244-4252.
- [198] T.-G. Iversen, T. Skotland, K. Sandvig, *Nano Today*, **2011**, 6, 176-185.
- [199] M. X. Tang, F. C. Szoka, *Gene Ther.*, **1997**, 4, 823-832.
- [200] T. Ito, Y. Koyama, M. Otsuka, *J. Pharm. Sci.*, **2014**, 103, 179-184.
- [201] Y.-C. Tseng, Z. Xu, K. Guley, H. Yuan, L. Huang, *Biomaterials*, **2014**, 35, 4688-4698.
- [202] K. Tahara, T. Sakai, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, *Int. J. Pharm.*, **2008**, 354, 210-216.
- [203] S. Freitas, B. Rudolf, H. P. Merkle, B. Gander, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2005**, 61, 181-187.
- [204] S. Freitas, G. Hielscher, H. P. Merkle, B. Gander, *Ultrason. Sonochem.*, **2006**, 13, 76-85.
- [205] F. D. Ledley, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1994**, 5, 626-636.

- [206] L. De Laporte, J. Cruz Rea, L. D. Shea, *Biomaterials*, **2006**, 27, 947-954.
- [207] G. Gregoriadis, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **1999**, 1, 39-42.
- [208] M. S. Shim, Y. J. Kwon, *FEBS J.*, **2010**, 277, 4814-4827.
- [209] G. L. Amidon, H. Lennernaes, V. P. Shah, J. R. Crison, *Pharm. Res.*, **1995**, 12, 413-420.
- [210] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, *J. Control. Release*, **2006**, 114, 100-109.
- [211] S. Markovic, L. Veselinovic, M. J. Lukic, L. Karanovic, I. Bracko, N. Ignjatovic, D. Uskokovic, *Biomed. Mater.*, **2011**, 6, 45001-45013.
- [212] Y. Cai, R. Tang, *J. Mater. Chem.*, **2008**, 18, 3775-3787.
- [213] A. Maitra, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **2005**, 5, 893-905.
- [214] A. E. Ewence, M. Bootman, H. L. Roderick, J. N. Skepper, G. McCarthy, M. Eppele, M. Neumann, C. M. Shanahan, D. Proudfoot, *Circ. Res.*, **2008**, 103, 28-34.
- [215] E.-J. Yi, J.-Y. Kim, Y.-S. Rhee, S.-H. Kim, H.-J. Lee, C.-W. Park, E.-S. Park, *Int. J. Pharm.*, **2014**, 466, 286-295.
- [216] U. Stange, C. Fuehring, H. Gieseler, *J. Pharm. Sci.*, **2014**, 103, 1233-1245.
- [217] T. Ishikawa, Y. Watanabe, N. Utoguchi, M. Matsumoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **1999**, 47, 1451-1454.
- [218] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *J. Control. Release*, **2011**, 151, 220-228.
- [219] J.-Y. Cherng, P. van de Wetering, H. Talsma, D. J. A. Crommelin, W. E. Hennink, *Pharm. Res.*, **1996**, 13, 1038-1042.
- [220] P. van de Wetering, J. Y. Cherng, H. Talsma, D. J. A. Crommelin, W. E. Hennink, *J. Control. Release*, **1998**, 53, 145-153.
- [221] Y.-Z. You, D. S. Manickam, Q.-H. Zhou, D. Oupicky, *J. Control. Release*, **2007**, 122, 217-225.
- [222] P. Dubruel, B. Christiaens, B. Vanloo, K. Bracke, M. Rosseneu, J. Vandekerckhove, E. Schacht, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2003**, 18, 211-220.
- [223] D. Lin, Q. Cheng, Q. Jiang, Y. Huang, Z. Yang, S. Han, Y. Zhao, S. Guo, Z. Liang, A. Dong, *Nanoscale*, **2013**, 5, 4291-4301.

- [224] D.-S. Lin, Y.-Y. Huang, Q. Jiang, W.-D. Zhang, X.-Y. Yue, S.-T. Guo, P. Xiao, Q. Du, J.-F. Xing, L.-D. Deng, Z.-C. Liang, A.-J. Dong, *Biomaterials*, **2011**, 32, 8730-8742.
- [225] S. Guo, Y. Huang, W. Zhang, W. Wang, T. Wei, D. Lin, J. Xing, L. Deng, Q. Du, Z. Liang, X.-J. Liang, A. Dong, *Biomaterials*, **2011**, 32, 4283-4292.
- [226] A. Basarkar, J. Singh, *Pharm. Res.*, **2009**, 26, 72-81.
- [227] M. Lindner, W. Meiners, K. Wissenbach, R. Smeets, R. Telle, H. Fischer, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2011**, 97, 466-471.
- [228] S. Yang, J. R. G. Evans, *Powder Technol.*, **2007**, 158, 56-72.
- [229] A. Frost, E. Bagouri, M. Brown, V. Jasani, *Eur. Spine J.*, **2012**, 21, 449-454.
- [230] K. Webb, V. Hlady, P. A. Tresco, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1998**, 41, 422-430.
- [231] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, R. Bizios, *Biomaterials*, **2000**, 21, 1803-1810.
- [232] P. Mainil-Varlet, R. Curtis, S. Gogolewski, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1997**, 36, 360-380.
- [233] J. Russias, E. Saiz, R. K. Nalla, K. Gryn, R. O. Ritchie, A. P. Tomsia, *Mater. Sci. Eng. C*, **2006**, 26, 1289-1295.
- [234] P.-L. Lin, H.-W. Fang, T. Tseng, W.-H. Lee, *Mater. Lett.*, **2007**, 61, 3009-3013.
- [235] S. Aunoble, D. Clement, P. Frayssinet, M. F. Harmand, J. C. Le Huec, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2006**, 78, 416-422.
- [236] L. Chen, C. Y. Tang, C. P. Tsui, D. Z. Chen, *J. Mech. Behav. Biomed.*, **2013**, 22, 41-50.
- [237] L. Cheng, S. M. Zhang, P. P. Chen, S. L. Huang, R. R. Cao, W. Zhou, J. Liu, Q. M. Luo, H. Gong, *Key Eng. Mat.*, **2006**, 309-311, 943-946.
- [238] C. Deng, J. Weng, X. Lu, S. B. Zhou, J. X. Wan, S. X. Qu, B. Feng, X. H. Li, *Mater. Sci. Eng. C*, **2008**, 28, 1304-1310.
- [239] M. Ding, J. Rojskjaer, L. Cheng, N. Theilgaard, S. Overgaard, *J. Biomed. Mater. Res. B*, **2012**, 100, 1826-1835.
- [240] Y. Hamada, W. Fujitani, N. Kawaguchi, K. Daito, T. Niido, A. Uchinaka, S. Mori, Y. Kojima, M. Manabe, K. Nishida, K. Arita, T. Nakano, N. Matsuura, *Dent. Mater. J.*, **2012**, 31, 1087-1096.

- [241] S. Hasegawa, J. Tamura, M. Neo, K. Goto, Y. Shikinami, M. Saito, M. Kita, T. Nakamura, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2005**, 75, 567-579.
- [242] M. Lindner, S. Hoeges, W. Meiners, K. Wissenbach, R. Smeets, R. Telle, R. Poprawe, H. Fischer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2011**, 97, 466-471.
- [243] S. Loher, V. Reboul, T. J. Brunner, M. Simonet, C. Dora, P. Neuenschwander, W. J. Stark, *Nanotechnology*, **2006**, 17, 2054.
- [244] A. Matsuo, H. Chiba, H. Takahashi, J. Toyoda, H. Abukawa, *Odontology*, **2010**, 85-88.
- [245] L. Zheng, F. Yang, H. Shen, X. Hu, C. Mochizuki, M. Sato, S. Wang, Y. Zhang, *Biomaterials*, **2011**, 32, 7053-7059.
- [246] H. Zhou, J. G. Lawrence, S. B. Bhaduri, *Acta Biomater.*, **2012**, 8, 1999-2016.
- [247] X. Wang, G. Song, T. Lou, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2010**, 21, 183-188.
- [248] Y. Shikinami, M. Okuno, *Biomaterials*, **1999**, 20, 859-877.
- [249] T. Kasuga, H. Maeda, K. Kato, M. Nogami, K. Hata, M. Ueda, *Biomaterials*, **2003**, 24, 3247-3253.
- [250] X. Deng, J. Hao, C. Wang, *Biomaterials*, **2001**, 22, 2867-2873.
- [251] Y. H. An, R. A. Draughn, *Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface*, USA, **2000**.
- [252] J.-W. Lee, J. A. Gardella, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 373, 526-537.
- [253] M. A. Slivka, C. C. Chu, Y. L. Zhang, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2001**, 12, 241-247.
- [254] D. L. T. Wise, D.J. Altobelli, *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*, New York, **1995**.

8. Anhang

8.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Ac-BSA	Acetyliertes bovines Serum Albumin
Ago2	Argonautenprotein 2
BCS	<i>Biopharmaceutical classification system</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CATK	Cathepsin K
CC	Calciumcarbonat
CCV	<i>Clathrin coated vesicles</i>
Chit	Chitosan
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EA	Elementaranalyse
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAP-Nano	Hydroxylapatit-Nanopartikel
HeLa	Henrietta Lacks
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
kDa	Kilodalton
MEM	<i>minimal essential medium</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M_w	mittlere Molmasse (Gewichtsmittel)
NFκB	<i>nuclear factor κ-light chain enhancer of activated B-cells</i>
O/W	Öl-in-Wasser
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
PDMAEMA	Poly(2- <i>N,N</i> -dimethylaminoethylmethacrylat)
pDNA	Plasmid-DNA
PE	Polyethylen
PEEK	Polyetheretherketon
PEI	Polyethylenimin
PGA	<i>Polyglycolic acid</i>
PLA	<i>Polylactic acid</i>
PLGA	Poly(<i>D,L</i> -lactic-co-glycolic acid)
PMMA	Polymethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RLC	<i>RISC-loading complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RP	<i>Rapid Prototyping</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TG	Thermogravimterie
THPP	5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)-porphyrin
TRAP	<i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>
TRBP	TAR-RNA-Bindeprotein
S/O/W	Feststoff-in-Öl-in-Wasser
UV	Ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
VSMCs	<i>vascular smooth muscle cells</i>

W/O/W

Wasser-in-Öl-in-Wasser

XRD

Röntgenpulverdiffraktometrie

8.2 Liste der verwendeten Geräte

Atomabsorptionsspektrometer	Thermo Electron, M-Serie
CLSM	Leica, SP5 LCSM
Dynamische Lichtstreuung	Malvern, Zetasizer Nano ZS
Elementaranalysator	Euro Vector, Euro EA
Energiedispersive Röntgenspektroskopie	EDAX, Genesis 4000
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiovert 40 CFL Keyence BZ900
Gefriertrocknungsanlage	Christ, Alpha 2-4 LSC
<i>Multi-Plate Reader</i>	Multiscan FC, ThermoFisher scientific, Vantaa, Finnland
Rasterelektronenmikroskop	FEI, Quanta 400 FEG
Reinstwasseranlage	Elga, Purelab Ultra Bioscience
Röntgendiffraktometer	Bruker D8 Advance
Tangential Flow Filtration	PALL
Thermowaage	Netzsch, STA 449 F3 Jupiter
Ultraschalldisperser	Hielscher, UP50 H Ultraschalldurchflussszelle, UIP250-Dmini
UV-Vis-Spektrometer	Varian, Cary 300 Bio
Zentrifuge	Hereaus Fresco 21, ThermoFisher scientific

8.3 Liste der verwendeten Chemikalien

Name	Hersteller	Bemerkung
Ac-BSA	Promega	
Ammoniak	Roth	30 %, p.a.
Calcit	Schaefer-Kalk	<200 nm
Calciumchlorid-Hexahydrat	Riedel de Haen	
Calcium L-lactat Pentahydrat	Fluka	p.a.
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Merck	
Chitosan	Aldrich	<i>low molecular weight</i> , 75-85 % deacetyliert
DAPI Dilactat	Invitrogen	
Diammoniumhydrogenphosphat	Fluka	p.a.
Dichlormethan	Fisher Scientific	
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	p.a.
DMEM	Life Technologies	
DMSO	Applichem	≥ 99,5 %
DNA	Sigma-Aldrich	Fragmentierte (<50 BP) Heringssperma DNA
DNA	Macherey-Nagel	pcDNA3-eGFP $M_w = 3\,621\,600\text{ g mol}^{-1}$
Ethanol	VWR	99,8 %
Eudragit E100	Evonik Industries	$M_w = 47\,000\text{ g mol}^{-1}$
FCS	Life Technologies	
FITC-BSA	Aldrich	66 kDa
Hydroxylapatit	Aldrich	<200 nm
Kaliumcarbonat	Riedel de Haen	
Lipofectamine®	Invitrogen	
MEM	Life Technologies	

Name	Hersteller	Bemerkung
Fluorescent Mounting Medium	Dako	
MTT	Life Technologies	
PBS	Life Technologies	
Polyethylenimin verzweigt	Aldrich	25 kDa
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich	30-70 kDa, 87-90% hydrolysiert
RESOMER RG 502H	Evonik Industries	$M_w = 7000-17000 \text{ g mol}^{-1}$
RESOMER LR704S	Evonik Industries	
siRNA	Invitrogen	anti-eGFP-siRNA $M_w = 14\,019,5 \text{ g mol}^{-1}$

8.4 Publikationsliste

Publikationen in referierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften

- G. Dördelmann, D. Kozlova, S. Karczewski, R. Lizio, S. Knauer and M. Epple, Calcium phosphate increases the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs (proteins, nucleic acids) into poly(*D,L*-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for intracellular delivery, *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 2, 7250-7259.
- G. Dördelmann, D. Kozlova and M. Epple, A pH-sensitive poly(methyl-methacrylate) copolymer for efficient drug and gene delivery across the cell membrane *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 2, 7123-7131.
- G. Dördelmann, T. Meinhardt, T. Sowik, A. Krueger, U. Schatzschneider, CuAAC click functionalization of azide-modified nanodiamond with a photoactivatable CO-releasing molecule (PhotoCORM) based on $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]^+$, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 11528-11530.
- G. Dördelmann, H. Pfeiffer, A. Birkner and U. Schatzschneider, Silicium dioxide nanoparticles as carriers for photoactivatable CO-releasing Molecules (PhotoCORMs), *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 4362-4367.

Sonstige Publikationen

- G. Dördelmann, M. Epple, pH-sensitive Eudragit®-Polymere als nanopartikuläre Wirkstoffträger, *BioNanoMaterials*, **2012**, 13, 66.
- G. Dördelmann, M. Epple, Calciumphosphat-Polymernanopartikel als Wirkstoffträger für die Gentherapie, *BioNanoMaterials*, **2013**, 14, 34.
- G. Dördelmann, M. Epple, R. Lizio, S. Grimm, H.U. Petereit, **Europäische Patentanmeldung** 14170333.0, Combined nanoparticle (angemeldet am 28.05.2014).

Wissenschaftliche Vorträge

- G. Dördelmann, D. Kozlova und M. Epple, pH-responsive calcium phosphate-polymer nanoparticles as a drug delivery system in gene therapy, *Annual Meeting of the Canadian Society of Biomaterials*, Halifax, Kanada, **2014** (Vortrag, „Best Presentation Award“).
- G. Dördelmann, D. Kozlova und M. Epple, Calciumphosphat-Eudragit®-E100-Nanopartikel als Wirkstoffträger für die Gentherapie, *Winterseminar der Medizinischen Fakultät*, Pichl, Österreich, **2014** (Vortrag).
- G. Dördelmann und M. Epple, Calciumphosphat-Polymernanopartikel als Wirkstoffträger für die Gentherapie, *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien*, Erlangen, **2013** (Vortrag).
- G. Dördelmann, D. Kozlova und M. Epple. Drug delivery from polymeric microparticles, *Workshop Biocompatible Coatings*, Tomsk, Russland, **2013** (Vortrag).
- G. Dördelmann und M. Epple, pH-responsive polymeric nanoparticles as a novel drug delivery system, *Materials Research Society Spring Meeting*, San Francisco, USA, **2013** (Poster).
- G. Dördelmann und M. Epple, pH-sensitive Polymere als nanopartikuläre Wirkstoffträger, *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien*, Hamburg, **2012** (Vortrag).

8.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Calciumphosphat und biodegradierbare Polymere als
Kompositmaterialien für Wirkstofftransport und Knochenersatz“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Haan, im März 2015

Gregor Dördelmann

10. Danksagung

Ich danke...

Herrn Prof. Matthias Eppe für das interessante, interdisziplinäre Forschungsthema an der Schnittstelle zwischen Chemie, Biologie, Medizin und den Materialwissenschaften, sowie für die stets geduldige Betreuung während meiner Promotionszeit, die gewährten Freiräume bei der Bearbeitung der Projekte und die vielen Forschungsaufenthalte und Vorträge auf Fachtagungen im In- und Ausland, die auf ewig gewonnen Eindrücke während des sibirischen Winters in Tomsk, im Frühjahr in San Francisco sowie während des kanadischen Sommers in Halifax,

Frau Prof. Bettina Siebers für die Begutachtung der Dissertation als Zweitgutachterin,

Herrn Dr. Rosario Lizio von der Evonik Industries AG für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die tiefen Einblicke in das Innovations- und Projektmanagement in einem Großkonzern und die außerordentlich gelungene Kooperation und die Unterstützung über den gesamten Zeitraum meiner Promotion,

Herrn Dr. Rafael Gentsch, Herrn Dr. Silko Grimm und Frau Dr. Jessica Albers von der Evonik Industries AG für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Projektbetreuung,

Frau Prof. Shirley Knauer und Sarah Karczewski für die Durchführung und Interpretation der CLSM-Aufnahmen sowie die geduldige Einweisung in den selbstständigen Umgang mit dem CLSM,

Frau Diana Kozlova für das anfängliche Einarbeiten im S1-Labor sowie die gelungene Zusammenarbeit im weiteren Verlauf unserer gemeinsamen Zeit im AK Prof. Eppler,

Frau Ursula Giebel, Herrn Smail Boukercha und ganz besonders Frau Kateryna Loza für die Durchführung der vielen REM-Aufnahmen,

Herrn Dr. Meyer-Zaika für die Anfertigung von TEM-Aufnahmen, insbesondere der zeitaufwändigen Mikrotomschnitte,

Herrn Dr. Oleg Prymak und Herrn Jürgen Gündel-Graber für die Durchführung der XRD-Messungen und die vielen kritischen Diskussionen,

Frau Kerstin Brauner und Frau Veronika Hiltenkamp für die Durchführung der Elementaranalyse,

Frau Carola Fischer für die Hilfe bei technischen Fragestellungen, Sonderanfertigungen von Geräten, die Unterstützung bei der EDV, die stetige Hilfsbereitschaft und ganz besonders für die dezenten Motivationstricks, Dinge einfach „mal abzuarbeiten“,

Frau Sabine Kiefer für die stetige Hilfsbereitschaft bei der Bearbeitung von An- und Aufträgen, speziell nach der Einführung von SAP,

Frau Dr. Janina Petrack und Herrn Bernhard Neuhaus für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit,

Frau Dr. Janina Petrack für die gemeinsame Zeit im Pförtner-Labor, speziell für die Ordnung, die Organisation, das Erinnern, die Einarbeitung zu Beginn und die gewachsene Freundschaft zum Schluss,

allen Mitarbeitern und Weggefährten für die vielen spannenden, lustigen und anstrengenden Tage und Nächte, die Freundschaft und Unterstützung im Labor,

meinen Eltern für die Unterstützung und die bedingungslose Liebe von klein auf,

meinen Schwiegereltern für alles, was Ihr in den letzten Jahren für unsere junge Familie getan habt,

meiner Frau Aleksandra für die Geduld und das Verständnis während dieser Zeit,

meiner Tochter Matilda für das Glück und die Zufriedenheit, die Du mir in Deinen ersten Lebenswochen geschenkt hast.

